



Síntesi, caracterització i estudi cromatogràfic d'oligoprolines com a agents d'afinitat

Arnau Novell Solerdelcoll



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA

PROGRAMA DE DOCTORAT: QUÍMICA ORGÀNICA EXPERIMENTAL I
INDUSTRIAL

SÍNTESI, CARACTERITZACIÓ I ESTUDI CROMATOGRÀFIC D'OLIGOPROLINES COM A AGENTS D'AFINITAT

Memòria presentada per Arnau Novell Solerdelcoll per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Directora: Dra. Cristina Minguillón Llombart

Doctorand: Arnau Novell Solerdelcoll

ARNAU NOVELL SOLERDELCOLL, 2015

Els estudis que es presenten en aquesta Tesi Doctoral han estat duts a terme en el període comprés entre Maig de 2010 fins al Febrer de 2014 en el sí del grup *Preparació de materials i estudis de reconeixement molecular enantioselectiu per a la separació d'enantiòmers mitjançant tècniques cromatogràfiques*, sota la supervisió de la Dra. Cristina Minguillón. Els experiments s'han realitzat en diferents ubicacions en tres etapes cronològiques consecutives. En primer lloc, es van dur a terme al laboratori de Peptidomimètics i Heterocicles Bioactius (Biosyner) del Parc Científic de Barcelona (Maig 2010 -Març 2011), seguidament al laboratori de Química Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, i finalment en el laboratori de Química Orgànica del Campus de l'Alimentació Torribera de la Universitat de Barcelona. En el curs de la tesi es va dur a terme una estada temporal (Febrer 2012-Maig 2012) en el *Brunel Institute For Bioengineering* (BIB) de la *Brunel University* (Uxbridge, Londres, Regne Unit). També, part dels experiments han estat possibles gràcies a l'instrument *Acquity UPC²* (Milford, Massachusetts, E.U.A), cedit per *Waters Spain, S.A.* i utilitzat en els seus laboratoris de Cerdanyola del Vallès (Barcelona) en el marc d'un acord de col·laboració.

La recerca ha estat finançada pel projecte del *Ministerio de Ciencia e Innovación* CTQ2010-15203/BQU. El doctorand ha gaudit de la beca de Formació de Investigadors (FI) de la Generalitat de Catalunya (període Març 2011 a Febrer de 2014).

Els treballs realitzats han donat lloc a diverses publicacions:

Arnau Novell, Alberto Méndez, Cristina Minguillón, "Effects of Supercritical Fluid Chromatography (SFC) on Enantioselectivity and Performance of Polyproline-derived Chiral Stationary Phases (CSPs)", *Journal of Chromatography A*, 1403 (2015) 138-143.

Arnau Novell, Cristina Minguillón, "Monolithic silica columns with covalently attached octaproline chiral selector. Dependence of performance on derivatization degree and comparison with a bead-based analogue", *Journal of Chromatography A*, 1384 (2015) 124-132.

Raquel Sancho, **Arnau Novell**, Frantisek Svec, Cristina Minguillón, "Monolithic silica columns functionalized with substituted polyproline-derived chiral selectors as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography", *Journal of Separation Science*, 37 (2014) 2805-2813.

Arnau Novell, Cristina Minguillón, "Octaproline, a conformationally flexible chiral selector in liquid chromatographic enantioseparation", *Journal of Chromatography A*, 1363 (2014) 109-118.

Arnau Novell, Cristina Minguillón, "Chiral chromatographic methods in the analysis and purification of enantiomers" en V. Andrushko i N. Andrushko (Editors), "Stereoselective Synthesis of Drugs and Natural Products", *Wiley*, (2013) 1601-1628.

Agraïments

El recorregut de la meva tesi doctoral ha estat, d'alguna manera, força accidentat, ja que he viscut dos trasllats a diferents laboratoris. No obstant, he tingut la oportunitat tant de realitzar una estada a l'estranger com de treballar en l'empresa privada. Sens dubte, durant tots aquests anys dedicats a aquest projecte, he tingut el plaer i la sort de conèixer a moltes persones que m'han brindat ajut professional i personal per tal d'assolir aquest objectiu. Fer un repàs de tots els que directa o indirectament han contribuït a aquest treball és una tasca llarga i difícil, i segurament, algú es quedaria injustament en l'oblit. Per això, vull agrair a tots ells la seva col·laboració. Les persones aquí citades són, certament, les més rellevants.

A la Dra. Cristina Minguillón, directora de la tesi doctoral, gràcies per haver confiat en mi, per tot el coneixement transmès i per la teva direcció durant tots aquests anys.

Al Dr. Miguel Feliz i a tot el personal dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona. Gràcies per tots els serveis oferts. Al Dr. Gerardo Acosta per tota la seva inestimable ajuda durant el procés d'escalat del selector quiral.

Als meus companys durant un any i escaig de la Unitat de Química Farmacèutica. I m'agradaria tenir una especial deferència per l'Ane, l'Eli i l'Eva.

I would also like to acknowledge Professor Ian Surtherland and Dr Svetlana Ignatova for their kind welcome during my short-stay in BIB. Also, I would like to thank the members of BIB staff that make me feel like home when I lived in UK.

A tots els meus companys de Torribera, en especial, a la Natalia. També vull donar les gràcies a en Joan per ajudar-me en tots els problemes de caràcter tècnic que m'he trobat. I a la Sandra per compartir els nervis de l'etapa final.

També m'agradaria tenir en consideració a tots els nois i noies de pràctiques que han contribuït en el meu projecte doctoral.

A l'Alberto de *Waters*, per treballar braç a braç durant algun període de vacances.

Així mateix agrair a totes les persones que heu estat al meu costat durant tots aquests anys. Tan a nivell professional, com sobretot a nivell personal, sapigheu que heu jugat un paper clau en la realització d'aquesta tesi. En particular a la meva família.

A tots vosaltres, als explícitament citats i als que no, moltes gràcies.

Als meus pares

Als meus germans,

Aleix i Albert

Índex

Abreviatures	v
1. Resum	1
2. Introducció	5
2.1. Aspectes Generals	7
2.1.1 L'homoquiralitat	7
2.1.2 Importància i aplicacions de l'enantioselectivitat	9
2.1.2.1 Importància de la quiralitat en el camp agroalimentari	13
2.2. Anàlisi de substàncies quirals	14
2.3. Mètodes preparatius per l'obtenció d'enantiòmers	15
2.4. Associació Selector Quiral – Enantiòmer	16
2.5. Selectors quirals utilitzats en cromatografia líquida enantioselectiva	18
2.6. Pèptids	20
2.7. La Prolina	21
2.7.1. Rigidesa i restricció conformacional	21
2.7.2. Isomerització <i>cis-trans</i> dels enllaços AA-Pro	22
2.7.3. Conformació de la cadena lateral del residu de prolina	23
2.8. Cadenes de poliprolina	24
2.8.1. Poliprolina II	26
2.8.2. Poliprolina I	27
2.9. Fases estacionàries quirals tipus poliprolina	28
2.9.1. Antecedents: Ús de la prolina com a fase estacionària quiral	28
2.9.2. Fases estacionàries quirals derivades d'oligoprolines	30
2.10. Capítol de Llibre:	
<i>Chiral Chromatographic Methods in the Analysis of Enantiomers</i>	47
3. Objectius	77

4. Recerca Experimental i Resultats	85
4.1. L'octaprolina, un selector quiral conformationalment flexible en les separacions cromatogràfiques enantioselectives	87
4.1.1. Precedents	87
4.1.2. Desenvolupament	87
4.1.3. Conclusions	89
4.1.4. Article I: <i>Octaprolina, a conformationally flexible chiral selector in liquid chromatographic enantioseparation</i>	91
4.2. Columnes monolítiques de sílice funcionalitzades amb selectors quirals derivats de poliprolina substituïts com a fases estacionàries quirals per a cromatografia d'alta resolució	103
4.2.1. Precedents	103
4.2.2. Desenvolupament	103
4.2.3. Conclusions <i>Monolithic silica columns functionalized with substituted polyproline-derived chiral selectors as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography</i>	105
4.3. Columnes monolítiques de sílice covalentment enllaçades a un SQ d'octaprolina. Estudi de la dependència del comportament cromatogràfic en el grau de derivatització i comparació amb la respectiva columna particulada	119
4.3.1. Precedents	119
4.3.2. Desenvolupament i conclusions	119
4.3.3. Article III: <i>Monolithic silica columns with covalently attached octaprolina chiral selector. Dependence of performance on derivatization degree and comparison with a bead-based analogue</i>	121
4.4. Efectes de les condicions supercrítics en l'enantioselectivitat i el comportament cromatogràfic de fases estacionàries quirals derivades de la poliprolina	133
4.4.1. Precedents	133
4.4.2. Desenvolupament i conclusions	134

4.4.3. Article IV: Effects of SFC conditions on enantioselectivity and performance of polyproline-derived CSPs	135
5. Discussió General	143
5.1. Aspectes generals	145
5.2. Estructura Química del Selector Quiral (SQ)	145
5.3. Comparació cromatogràfica entre la FEQ-5 i la FEQ-2	146
5.4. La importància de la fase mòbil	148
5.5. Materials monolítics com a noves fases estacionàries	149
5.5.1. Avaluació de l'eficiència i la permeabilitat de les columnes monolítiques	150
5.5.2. Dependència del comportament cromatogràfic del contingut de selector quiral	152
5.5.3. Dependència del comportament cromatogràfic de la matriu cromatogràfica	153
5.5.4. Capacitat de càrrega	154
5.6. Aplicació de cromatografia de fluids supercrítics (SFC) a les fases estacionàries quirals (FEQs) de la família de les oligoprolines	157
6. Conclusions	159
7. ANNEX I: Polimerització de L-Prolina	163
7.1. Aspectes Generals	165
7.1.1. Antecedents	165
7.2. Polimerització directa de la L-Prolina	168
7.3. Resultats i discussió	169
7.4. Intents de caracterització del material obtingut	171
7.4.1. Massa de polímer	171

7.4.2. Intents de fraccionament per HPLC	171
7.4.3. Ressonància magnètica nuclear	172
7.4.4. Espectrometria de masses (MALDI-TOF)	173
7.4.5. Proves de solubilitat	175
7.5. Notes concloents	176
8. Bibliografia	177

Abreviatures

1-BuOH	1-Butanol
2-PrOH	2-Propanol
AA	Aminoàcids
Ac	Acetil
ADME-Tox	Absorció, distribució, metabolisme, excreció i toxicitat
anh	Anhídre
APS	Aminopropil sílice
Boc	<i>tert</i> -Butiloxicarbonil
ACN	Acetonitril
Cbz	Carboxibenzil
CCC	Cromatografia en contracorrent <i>Countercurrent chromatography</i>
CE	Electroforesi capil·lar <i>Capillary electrophoresis</i>
CEC	Electrocromatografia capil·lar <i>Capillary electrochromatography</i>
CH ₂ Cl ₂	Diclorometà o clorur de metilè
CHCl ₃	Triclorometà o cloroform
CDCl ₃	Triclorometà o cloroform deuterat
DCE	Dicloroetà
DCM	Diclorometà o clorur de metilè
DEA	Dietilamina
DEG	Dietilenglicol
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida

DiTFAE	2,2,2-Trifluoro-1-[10-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil-antracen-9-il)]-etanol
DMF	Dimetilformamida
DNB	Dinitrobenzoïl
DPPA	Difenilfosforil azida <i>Diphenylphosphoryl azide</i>
ECD	Dicroisme circular electrònic <i>Electronic circular dichroism</i>
ee	Excés enantiomèric
EEDQ	<i>N</i> -Etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina
eq	Equivalents
EUA	Estats Units d'Amèrica
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FEQ	Fase estacionària quiral
Fmoc	Fluorenilmetoxycarbonil
FN	Fase normal
GC	Cromatografia de gasos <i>Gas chromatography</i>
H o HETP	Altura equivalent d'un plat teòric <i>Height equivalent to a theoretical plate</i>
HMFS	Àcid <i>N</i> -[(9-Hidroximetil)-2-fluorenil]succinàmic <i>N-[(9-Hydroxymethyl)-2-fluorenyl]succinamic acid</i>
HOBt	1-Hidroxibenzotriazole
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució <i>High performance liquid chromatography</i>

ICH	Conferència internacional sobre harmonització <i>International Conference on Harmonization</i>
IR	Infraroig
JCR	<i>Journal of citation reports</i>
k	Factor de capacitat
K_a	Constant d'equilibri
LC	Cromatografia líquida <i>Liquid chromatography</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption ionization – Time of flight</i>
MAPS	Metilaminopropil sílice
MeOH	Metanol
MTBE	Metil <i>tert</i> -butil èter
N	Nombre de plats teòrics
OBn	O-Benzil
PM	Pes molecular
PMP	p-Metoxifenil
PPI	Poliprolina I <i>Polyproline I</i>
PPII	Poliprolina II <i>Polyproline II</i>
Pro	Prolina
Pyr	Piridina
SFC	Cromatografia de fluids supercrítics <i>Supercritical fluid chromatography</i>
SMB	Cromatografia de llit mòbil simulat <i>Simulated moving bed</i>

SQ	Selector quirai
T	Temperatura
TAPA	(R)-(-)-2-(2,4,5,7-tetranitro-9-fluorenilideneaminoxipropionil
TCM	Triclorometà
TEA	Trietilamina
Tfa	Trifluoroacetil
TFA	Àcid trifluoracètic Trifluoroacetic acid
THF	Tetrahidrofurà
TLC	Cromatografia en capa fina Thin layer chromatography
Tma	Trimetilacetil
t_r	Temps de retenció
UPC ²	<i>Ultraperformance convergence chromatography</i>
UPLC	<i>Ultraperformance liquid chromatography</i>
VCD	Dicroisme circular vibracional Vibrational circular dichroism
α	Factor de separació
ΔG°	Increment d'energia lliure estàndard de Gibbs
ΔH°	Increment d'entalpia estàndard
ΔS°	Increment d'entropia estàndard

RESUM

Resum

En un ambient biològic, intrínsecament asimètric, l'activitat de les substàncies quirals pot estar fortament condicionada per la seva estereoquímica. Aquesta és la raó per la qual les tècniques enantioselectives han esdevingut una eina essencial tant per la determinació analítica de la composició en enantiòmers d'una mostra com per la obtenció i preparació d'aquests isòmers de manera separada.

Tot i que existeix un nombre considerable de procediments i tècniques quirals, la cromatografia juga un paper molt rellevant en aquest context. És per això que la recerca de noves fases estacionàries quirals (FEQs) capaces de resoldre un ventall extens de parells d'enantiòmers segueix sent de transcendental importància. En aquest aspecte, un dels avenços més sorprenents i inesperats és l'ús de selectors quirals (SQs) derivats de cadenes d'oligoprolines. En estudis anteriors, FEQs derivatitzades amb aquest tipus d'estructures com a SQ van presentar valors d'enantioselectivitat i resolució, així com un rang d'aplicació, similars o superiors als de FEQs que contenen SQs d'un pes molecular similar.

En la present tesi doctoral, es presenta la síntesi d'un SQ de tipus octaprolina més senzill que els estudiats en treballs anteriors amb la idea d'estudiar si les propietats particulars observades prèviament en derivats més complexes són generalitzables. Per això, es descriu la síntesi d'un octapeptid de prolina que es duu a terme mitjançant un procediment de síntesi peptídica en fase sòlida (SPPS) tipus Fmoc. En el pèptid obtingut se li afegeix un grup terminal trimetilacetil (Tma) i a partir d'aquí es procedeix a l'ancoratge sobre sílice gel. Posteriorment es procedeix l'empaquetament de la columna quiral amb el material resultant. El comportament cromatogràfic de la nova FEQ s'avalua i es compara amb FEQs similars que contenen grups 3,5-dimetilfenilcarbamat en la posició 4 de l'anell de pirrolidina de tots els monòmers que constitueixen la cadena. És en aquest punt on s'estableix un mecanisme d'enantioreconeixement principalment basat en interaccions mitjançant enllaços per pont d'hidrogen.

A més a més, l'ús de diferents condicions cromatogràfiques permet estudiar la dependència de l'enantioselectivitat respecte la fase mòbil utilitzada. Quan s'utilitzen mescles d'un alcà i un alcohol, o d'un alcà i un èter com a fase mòbil, s'obtenen valors d'enantioselectivitat força semblants. En canvi, en absència d'un dissolvent amb grups donadors d'enllaços d'hidrogen i amb presència de dissolvents clorats, força habituals en separacions enantioselectives, els factors de separació pràcticament s'anul·len. No obstant, es demostra que la desaparició de l'enantioselectivitat és un fenomen

totalment reversible que s'atribueix al canvi conformacional que experimenten les cadenes de poliprolina segons el dissolvent en el qual es troben immerses

Seguidament, diferents SQs de la família de les oligoprolines s'uneixen a columnes monolítiques de gel de sílice. La derivatització es realitza per etapes i es procedeix a testar l'enantioselectivitat després de cada reacció. Així, es pot demostrar que l'habilitat enantioselectiva, la resolució i l'eficiència depenen de la quantitat de SQ contingut dins de cada columna, resultant ser la columna més derivatitzada la que exhibeix un millor comportament cromatogràfic. Quan les columnes monolítiques amb el mateix SQ es comparen amb les seves anàlogues que contenen una matriu constituïda per partícules de sílice, les primeres mostren millor enantioselectivitat i un espectre d'aplicació més ampli. Finalment, quan s'examina la capacitat de càrrega, aquesta és de l'ordre de 3 a 20 vegades superior per les columnes monolítiques que les respectives constituïdes per partícules.

Finalment, l'enantioselectivitat i el comportament cromatogràfic de diferents FEQs tipus oligoprolina es proven en condicions de fluids supercrítics, obtenint-se valors favorables d'enantioselectivitat, resolució i eficiència. Aquests valors són encara més positius quan es combinen les condicions de cromatografia de fluids supercrítics amb columnes de suports monolítics. No obstant, la millora més notable en aquestes noves condicions és la significant reducció del temps d'anàlisi, fet que obre les portes a utilitzar aquest tipus de FEQs per treballar en condicions de *high-throughput*.

INTRODUCCIÓ

Introducció

2.1. Aspectes generals

2.1.1. L'homoquiralitat

La simetria és un concepte tenyit per la concepció humana de formes harmonioses i estèticament agradables, i que massa sovint, la seva vessant més adulterada recau sobre la ciència. No obstant, la seva estricta interpretació matemàtica basada en mesures geomètriques ha estat un instrument molt valuós pels científics de diferents disciplines. Per tant, la simetria s'empra per tal d'estudiar la naturalesa d'una manera més clara, intel·ligible i concisa. Però, és el trencament d'aquesta, és a dir, l'asimetria, la que ens descriu la vida d'una manera absoluta.

De fet, moltes formes i moviments aparentment simètrics en el món natural són en realitat exemples de simetries trencades [1]: l'helicitat de les closques dels cargols i d'alguns mol·luscs, la forma de serpentí d'algunes plantes com el llúpol o la mongetera, el moviment helicoidal dels espermatozous, l'ullal levogir dels narvals o les nostres mans. Però el perquè d'aquesta asimetria macro s'ha de buscar en una microasimetria a nivell molecular, en la quiralitat de les biomolècules.



Figura 2.1. Exemples de quiralitat en la naturalesa. D'esquerra a dreta i de dalt a baix: i) les closques dels cargols. ii) el moviment dels espermatozous. iii) les mans de dos nens. iv) plantes de llúpol. v) l'ullal dels narvals.

La qüestió de l'origen de la quiralitat, la propietat de les molècules de no ser superposables a la seva imatge en un mirall, ha estat un puzzle no resolt des que

Pasteur va introduir per primera vegada aquest concepte a la química [2]. L'origen i el propòsit de l'homoquiralitat - el perquè la vida es basa tan sols en un dels dos possibles enantiòmers, és a dir, en L-aminoàcids i en D-monosacàrids i no en les seves imatges especulars - han estat debatuts extensament per científics de diferents àmbits.

Alguns argumenten teories biòtiques que es basen en l'existència d'un nombre igual dels dos enantiòmers de cada molècula al principi de la vida, i que fou la pròpia evolució la que va produir un desequilibri. No obstant, aquesta teoria s'ha tornat cada cop més impopular degut a la constatació que l'evolució de les espècies, per sí sola, no hauria estat capaç d'aportar la selecció natural necessària per tal d'afavorir la forma levogira o dextrogira, o viceversa, de cada molècula.

No obstant, les teories més seductores sobre la quiralitat molecular són prebiòtiques, anteriors a l'inici de la vida [3]. Tot i que no existeix una sola teoria universal, totes les hipòtesis es fonamenten en 3 passos essencials successius: 1) *Trencament de la simetria molecular*: Creació d'un desequilibri enantiomèric basant-se en dos fets experimentalment ja demostrats: i) les molècules orgàniques provenen de l'espai exterior [4–8] ii) es poden obtenir petits excessos enantiomèrics (ee) de molècules orgàniques quirals (d'entre elles aminoàcids) recreant condicions cosmològiques (simulant l'espai) [9,10]. 2) *Amplificació quiral*: Enantioenriquiment d'aquest desequilibri. Diferents experiments senyalen que la presència d'una petita quantitat de producte amb excés enantiomèric a l'inici d'una reacció pot resultar en un excés enantiomèric considerablement major al final d'aquesta (Figura 2.2.a) [11,12]. 3) *Transmissió quiral*: Transferència d'aquesta quiralitat d'una molècula a una altra [13], tal i com passa en les reaccions de Mannich catalitzades per prolina [14,15].

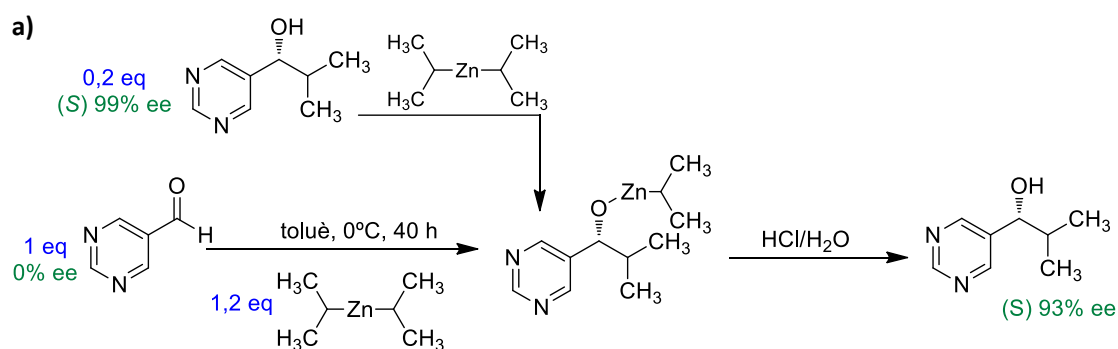


Figura 2.2. a) Reacció de Soai, un exemple d'amplificació quiral [11]. En alguns sistemes de reaccions autocatalítiques la presència d'una petita quantitat de producte amb excés enantiomèric al inici de la reacció desencadena en un excés enantiomèric significativament major al final d'aquesta.

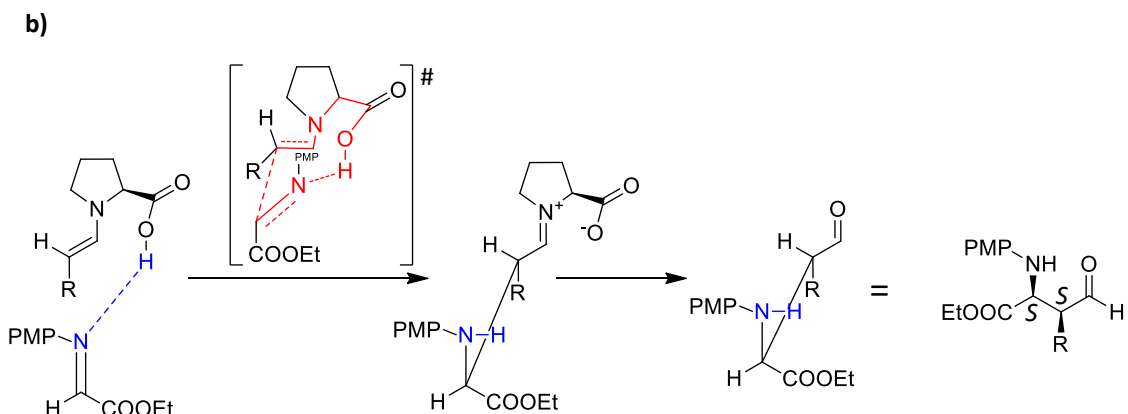


Figura 2.2. b) Mecanisme organocatalític de la reacció de Mannich catalitzada per prolina. Es produeix una transferència de quiralitat des de l'enamina resultant de la reacció del compost carbonílic que es vol fer reaccionar, a la imina aquiral sobre la que reacciona l'anterior [15]. En la reacció es formen dos centres estereogènics de configuració fixada pel de la L-prolina que s'utilitza com a catalitzador. (PMP: p-metoxifenil).

Tot i que els interrogants continuen sent nombrosos, en l'homoquiralitat es reconeix un rol transcendental de l'enantioselectivitat. En química, ens referim a una reacció enantioselectiva quan en aquesta es produeix la formació preferencial d'un dels dos enantiòmers sobre l'altre, com a resultat d'una especificitat inherent de la reacció o de la influència de les característiques del substrat, reactius, catalitzadors o del propi medi. No obstant, la definició d'enantioselectivitat es pot generalitzar com la mera preferència per un dels dos enantiòmers possibles per un compost.

2.1.2. Importància i aplicacions de l'enantioselectivitat

Des dels anys 80, l'enantioselectivitat ha adquirit una rellevància cabdal en el camp farmacèutic, que acapara des del disseny i desenvolupament de nous fàrmacs, passant per l'optimització de fàrmacs ja existents, fins a l'anàlisi de molècules quirals de principis actius i de medicaments finals. Aquest fet és degut a l'observació d'una resposta diferenciada de l'organisme en funció de l'estereoquímica de la molècula exògena administrada al pacient, ocasionada per una interacció preferent de la diana terapèutica amb un dels dos enantiòmers del principi actiu o bé per un perfil ADME-Tox diferenciat pels dos enantiòmers.

Per tant, no és sorprenent que els enantiòmers de moltes molècules quirals presentin efectes diferenciats. Per exemple, el tetramisole (Figura 2.3.a) és un antihelmíntic, inicialment administrat en forma racèmica. Degut als nombrosos efectes secundaris (vertigen, dolor abdominal, vòmits) atribuïts al isòmer (*R*), actualment només l'enantiòmer (*S*) s'utilitza en terapèutica (levamisole) [16]. Altres fets diferencials es manifesten generalment com a diferències en la potència dels enantiòmers per a una mateixa activitat farmacològica, sent-ne un exemple il·lustrador els àcids arilpropionics o profens (Figura 2.3.b) [17]. Com a cas extrem, un enantiòmer pot actuar com a

antagonista de l'efecte de l'altre (pícnadol, Figura 2.3.c) [18]. També s'han observat altres casos peculiars, com que els dos enantiòmers puguin presentar activitats diferents (efecte dual), o bé que un dels dos pugui resultar tòxic. No obstant, un dels casos més curiosos correspon a la terbutalina (Figura 2.3.d). S'ha comprovat que el distòmer pot actuar d'una manera sinèrgica amb el corresponent eutòmer, promovent-ne l'absorció.

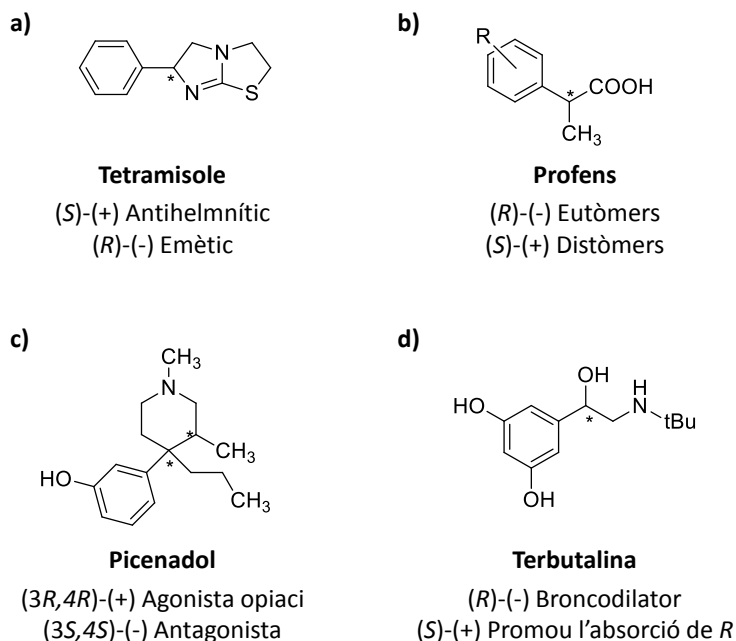


Figura 2.3. Exemples de fàrmacs quirals amb diferent activitat farmacològica.

Així doncs, l'administració de fàrmacs com enantiòmers purs presenta una sèrie d'avantatges sobre els seus anàlegs racèmics: presenten una relació més directa entre la concentració plasmàtica i l'efecte farmacològic, és a dir, un perfil farmacodinàmic menys complex i més selectiu. També s'observa, en general, un índex terapèutic millorat, així com un menor potencial d'interacció amb altres fàrmacs [19]. Tot això es tradueix, d'una banda, en la possibilitat de reduir la dosificació de principi actiu, reduint-ne el cost de producció, i per l'altra, en una reducció de la variabilitat de l'efecte terapèutic, i conseqüentment dels seus efectes tòxics [20].

A més a més, des de principis dels anys 90, la ICH (*International Conference on Harmonization*) [21] ha promulgat una sèrie de directives de referència, d'obligat compliment en els països desenvolupats. Aquesta regulació contempla la identificació de termes quirals específics, com l'avaluació farmacocinètica i la quantificació considerant les diferències entre enantiòmers (dosi-resposta), limitant el percentatge d'isòmer que pot constar com a impuresa de l'altre. D'acord amb la normativa vigent, s'ha de conèixer la composició d'un fàrmac quiral en els estudis farmacològics, toxicològics i clínics [22]. Actualment, les directives internacionals no prohibeixen explícitament la comercialització de nous fàrmacs racèmics i la decisió en relació a

l'estereoquímica de la molècula la pren el fabricant. No obstant, aquesta decisió requereix d'una justificació científica basada en la qualitat, seguretat i eficàcia del compost [23]. La qual cosa fa que, a la pràctica, la gran majoria dels nous fàrmacs es desenvolupin i comercialitzin com a enantiòmers únics.

Finalment, a tot això cal sumar-hi l'anomenat *chiral switch*. Aquesta pràctica consisteix en el desenvolupament d'un nou fàrmac enantiomèricament pur a partir d'un fàrmac existent en forma racèmica [17,24,25]. El *chiral switch* també ha permès en alguns casos als laboratoris allargar els períodes d'exclusivitat per aquells fàrmacs racèmics les patents dels quals es trobaven a punt de vèncer (Figura 2.4.). En altres aquest fenomen ha portat que el fàrmac enantiomèricament pur no s'arribés mai a comercialitzar. En ocasions el laboratori que patentava el fàrmac enantiomèricament pur era un laboratori aliè al que ostentava la patent del racèmic i sense possibilitats de portar el fàrmac al mercat. Quan la compra de la patent d'aquest segon laboratori per part del laboratori original no es produïa, l'assumpte conduïa a un carreró sense sortida.

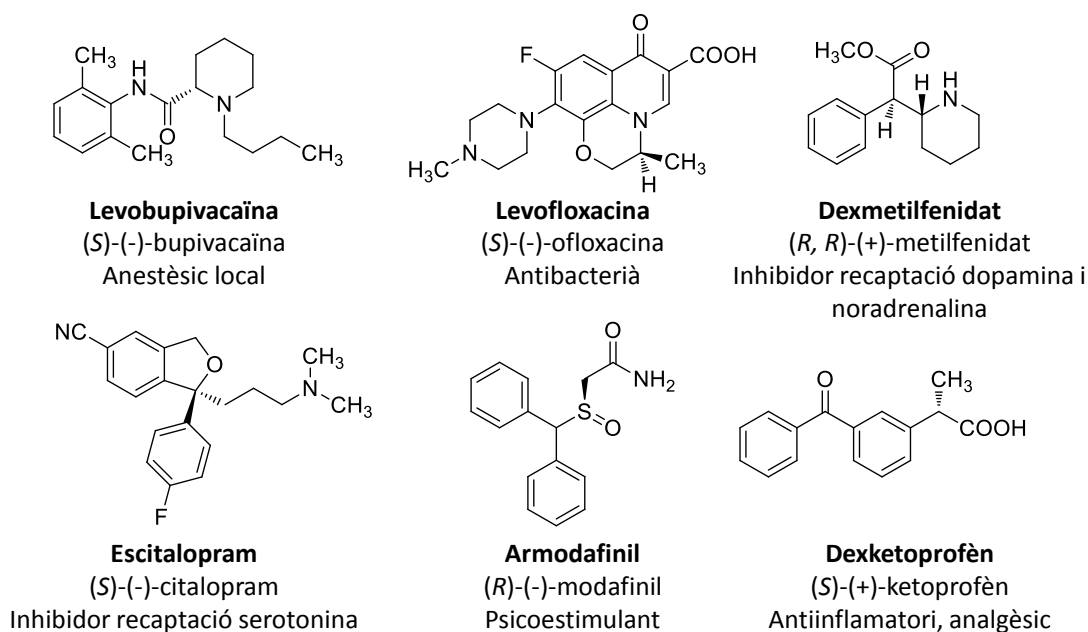
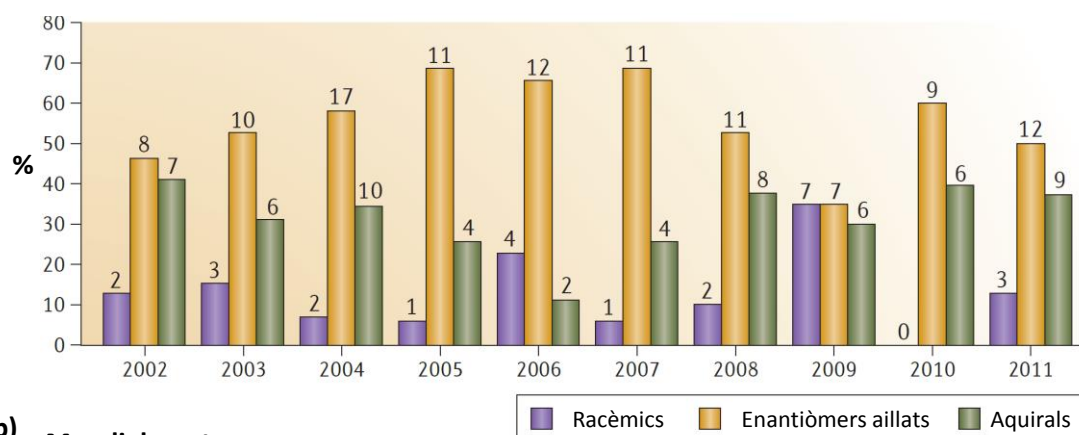


Figura 2.4. Exemples de fàrmacs que, un cop comercialitzats com a mescla racèmica, han sortit al mercat com a enantiòmers aïllats (*chiral switch*).

Degut a tots els motius anteriors no és sorprenent que durant la última dècada la majoria de principis actius s'aproveïssin com un sol enantiòmer (Figura 2.5) [26]. De fet, de 195 noves molècules aprovades per la *Food and Drug Administration* (FDA) i de 205 a nivell mundial, 108 (55%) i 130 (63%) respectivament, corresponen a enantiòmers aïllats. Les molècules aquirals ocupen el segon lloc i les mescles racèmiques no desapareixen. De fet, el desenvolupament d'aquestes últimes es basa principalment en consideracions estratègiques de les companyies farmacèutiques, tal i

com evitar processos de síntesi asimètrica i/o de resolució enantiomèrica, per tal de reduir costos de producció i escurçar el temps per aconseguir l'aprovació.

a) FDA



b) Mundialment

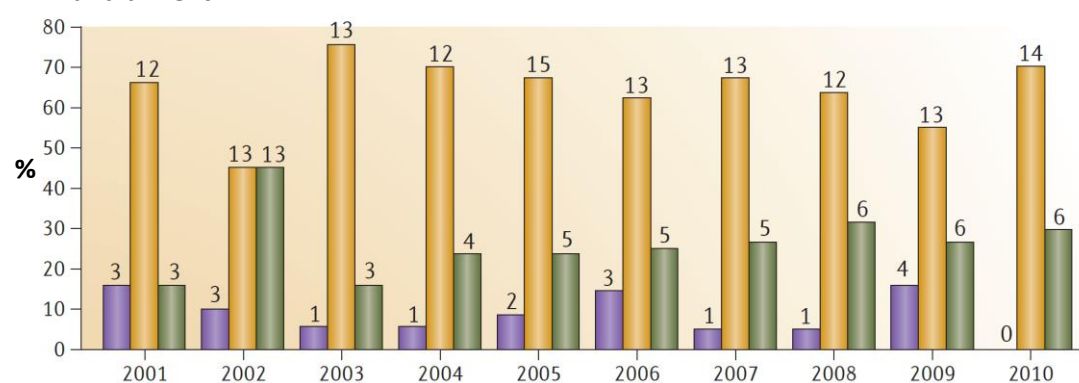


Figura 2.5. Evolució de la quiralitat dels fàrmacs [26]. El percentatge (eix de les y) i el nombre (mostrat sobre les barres) de fàrmacs aprovats com a racèmics, enantiòmers purs i molècules aquirals per: a) la nord-americana FDA durant el període (2002-2011) i b) mundialment durant el període 2001-2011

Aquesta tendència segueix actualment, tant és així que 3 dels 5 fàrmacs més venuts als Estats Units durant l'any 2013 són enantiòmers aïllats [27]. Mentre que els altres dos corresponen a una molècula aquiral i a un anticòs monoclonal, un medicament d'origen biotecnològic.

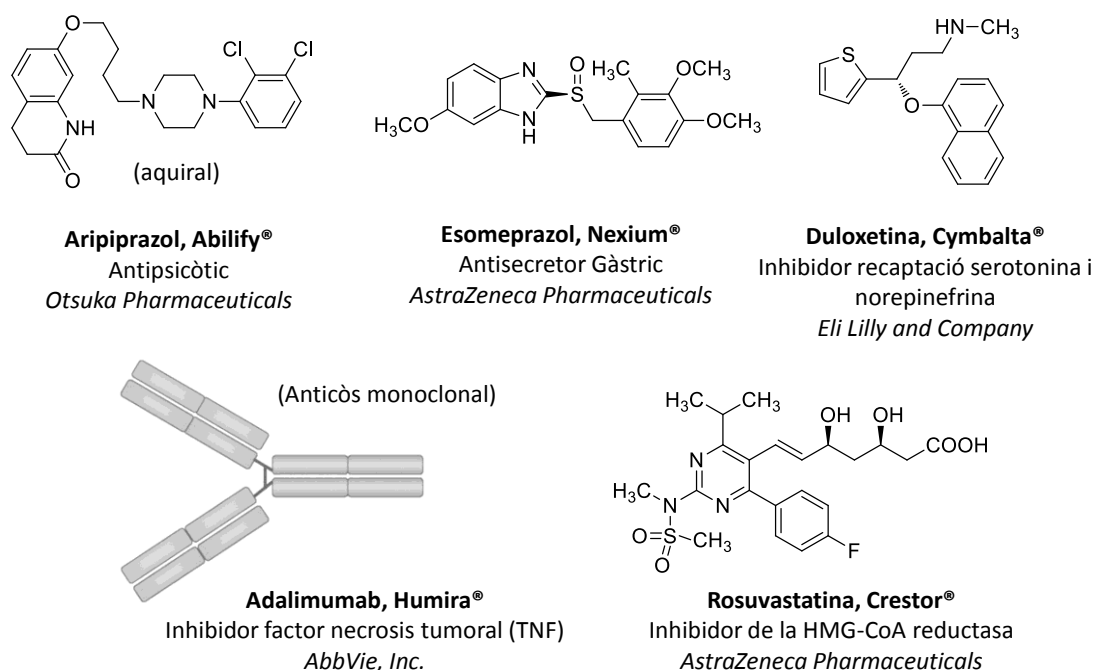


Figura 2.6. Els 5 fàrmacs més venuts al per menor als EUA durant l'any 2013, ordenats per facturació, d'esquerra a dreta i de dalt a baix [27].

2.1.2.1. Importància de la quiralitat en el camp agroalimentari:

Aquesta manera de procedir, promovent l'elecció del caràcter enantiòmer o racèmic del fàrmac en desenvolupament, va comportar grans avenços científics i tecnològics en el camp de l'anàlisi de components quirals, amb la conseqüent transferència de coneixement des del terreny farmacèutic a altres camps. De fet, l'anàlisi quiral està jugant un paper cada cop més important en el camp de l'alimentació. La determinació de substàncies quirals és una nova manera d'avaluar la qualitat, la procedència, la seguretat, el processat i l'autenticitat dels aliments [28].

Des del punt de vista nutricional és ben sabut que la racemització d'aminoàcids en disminueix el seu valor així com la qualitat del producte. Per tal d'establir l'edat de diferents vins blancs, rosats i escumosos, Brückner i col·laboradors han correlacionat les quantitats de D-AA [29] amb el temps d'emmagatzematge del vi. Com que els aminoàcids també racemitzen en determinades condicions, Csapó i col·laboradors avaluen l'efecte l'extensió de racemització dels aminoàcids de mostres d'extracte de soja seques durant el seu processat (processos d'extrusió, operant a diferents temperatures i velocitats angulars). Es va demostrar l'increment de racemització produït pel procés [30], amb la consegüent disminució de les propietats nutricionals del material processat.

Un altre paràmetre important d'avaluar és la toxicitat del menjar, i per tant, cal detectar la presència de xenobiòtics en mostres alimentàries. De fet, la composició

enantiomèrica de compostos amb activitat insecticida, herbicida, pesticida o fungicida està regulada per les autoritats ja que l'ús d'un sol enantiòmer permet la reducció de la taxa d'aplicació, la toxicitat i dany ambiental d'aquestes substàncies. Diferents estudis senyalen que l'activitat dels fungicides metalaxil i benalaxil recau fonamentalment sobre l'enantiòmer (*R*) [31,32]. Zhang i col·laboradors duren a terme la determinació enantiomèrica dels mencionats fungicides (Figura 2.7) en fruites i hortalisses comprovant que els límits sobrepassaven els establerts [33].

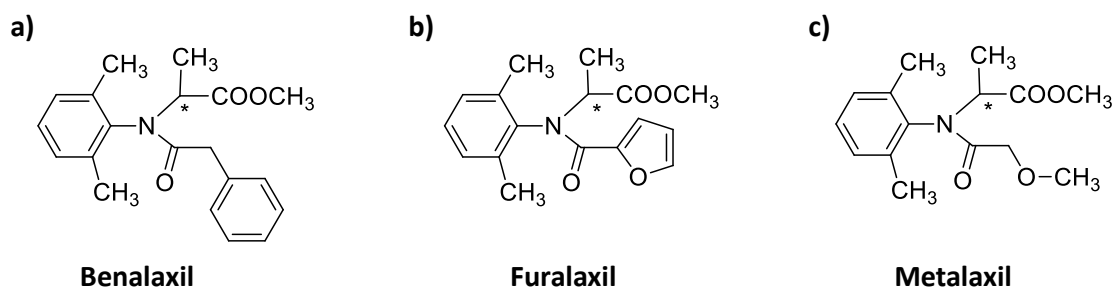


Figura 2.7. Fungicides estudiats per Zhang i col·laboradors[33].

2.2. Anàlisi de substàncies quirals [34]

Els enantiòmers són estereoisòmers amb les mateixes propietats fisicoquímiques i, per tant, indistingibles en les condicions isotròpiques convencionals. Les diferències només emergeixen quan s'exposen a un ambient quiral anisotròpic, tal i com la radiació electromagnètica circularment polaritzada o la presència d'altres estructures quirals [34]. Així doncs, quan s'ha de realitzar una anàlisi dels enantiòmers es poden dur a terme dues aproximacions diferents.

Per una banda, es pot realitzar una determinació indirecte que consisteix en convertir els enantiòmers en compostos diastereomèrics per mitjà d'una reacció amb un reactiu enantiomèricament pur, l'anomenat agent de derivatització quiral. Conseqüentment, els estereoisòmers resultants diferiran en les seves propietats físico-químiques i es podran analitzar mitjançant mètodes convencionals. Per tant, aquests agents de derivatització quiral serviran per a la determinació indirecte de la composició enantiomèrica en tècniques d'anàlisi d'ús comú [34] com la ressonància magnètica nuclear (RMN) [35], la cromatografia de gasos (GC) [36] o la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) [37]. Encara que els mètodes indirectes poden ser beneficiosos en certes ocasions, aquests solen estar considerats com a mètodes que requereixen un llarg temps de preparació i/o anàlisi [38] i que poden estar afectats per inexactituds atribuïdes a la reacció [39], i per tant, no s'adeqüen als requisits *high-throughput* de la indústria de química fina.

Per altra banda, els mètodes directes consisteixen en la determinació d'enantiòmers en un ambient intrínsecament quiral. De fet, existeixen diferents tècniques per tal de determinar la composició enantiomèrica que es classifiquen en dos grans grups: i) Les tècniques que es duen a terme sense una separació dels enantiòmers, com la polarimetria o la RMN utilitzant agents de solvatació quiral [40]. ii) Les aproximacions que sí separen els enantiòmers, bàsicament les diferents tècniques cromatogràfiques (GC, HPLC, SFC, CCC) i l'electroforesi.

2.3. Mètodes preparatius per a l'obtenció d'enantiòmers [34]

Tot i que la síntesi asimètrica o estereoselectiva implica l'obtenció majoritària de l'enantiòmer desitjat, aquesta pot suposar un procés sovint costós i laboriós. A més a més, el producte obtingut acostuma a requerir d'una posterior fase d'enriquiment de la forma desitjada, ja que la puresa enantiomèrica obtinguda no sol assolir els requeriments estipulats per les autoritats reguladores [41].

Per contra, la separació d'enantiòmers a partir d'una barreja racèmica suposa un rendiment limitat al 50% en l'etapa en què es realitza la separació, cosa que redueix el rendiment global del procés de producció. No obstant, l'enantiòmer no desitjat se sol racemitzar i reciclar. D'aquesta manera es millora el rendiment. Tot i així, no sempre l'obtenció de la mescla racèmica és un inconvenient, ja que en els primers estadis del desenvolupament dels nous fàrmacs, s'han de realitzar assajos amb els dos enantiòmers per separat [42] i aquí la síntesi del racèmic combinada amb l'ús de les tècniques separatives són la primera elecció.

Degut a l'auge de les tècniques enantioseparatives en el terreny analític, les tècniques cromatogràfiques de separació directa dels enantiòmers es van extrapol·lar a fins productius on s'utilitzen cada cop més. Tenen al seu favor el fet de ser d'aplicació per compostos de diversa estructura sense el requeriment d'una derivatització prèvia o la condició d'aplicació a materials sòlids, i per tant, es tracta de procediments molt generals. No obstant, es poden utilitzar de forma exclusiva o en combinació amb les tècniques de separació o de síntesi enantioselectiva. De totes les modalitats de cromatografia, la de *simulated moving bed* o cromatografia de llit mòbil simulat (SMB) és la més usada a escala preparativa [43]. Un dispositiu de SMB està format per múltiples columnes quirals disposades en forma anular entre les que es canvia, de forma periòdica mitjançant vàlvules, l'entrada i la sortida de dissolvents, el punt d'injecció de barreja i de recol·lecció de derivats purificats (Figura 2.8). Amb aquest canvi, realitzat sempre en la mateixa direcció en la que circula la fase mòbil líquida, es simula el moviment.

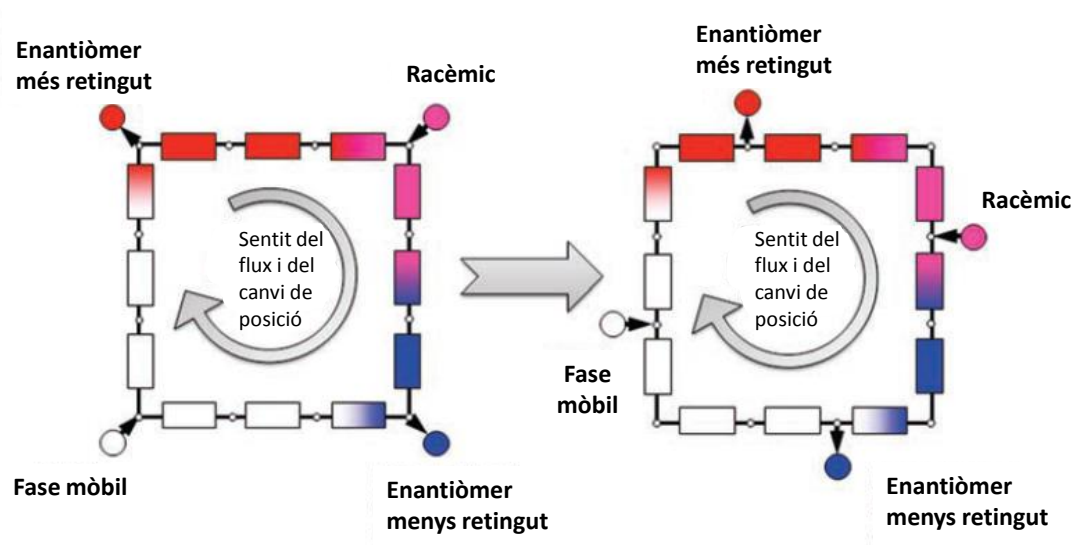
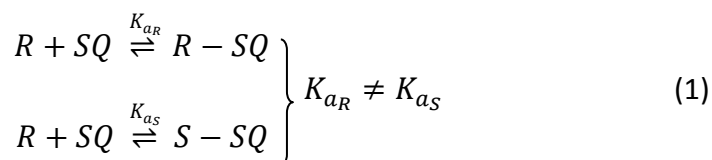


Figura 2.8. Diagrama esquemàtic del funcionament d'un sistema SMB. Les columnes estan connectades del cap a la cua, intercalant vàlvules. Hi ha dos fluxos d'entrada, el d'alimentació (racèmic) i l'eluent (fase mòbil), i dos fluxos de sortida, l'extracte (enantiòmer més retengut) i el refinat (enantiòmer menys retengut). Després d'un cert temps, les posicions d'entrada i de sortida es mouen, simulant, així, el moviment de la fase estacionària [34].

2.4. Associació Selector Quiral – Enantiòmer [34]

Sens dubte, es pot concloure que el desenvolupament més notable i singular en el camp de la separació d'enantiòmers en els últims 35 anys ha estat la introducció i ràpida implementació de l'HPLC per aquesta finalitat [44,45]. Per tal de dur a terme una separació enantiomèrica en cromatografia cal introduir en el procés un ambient quiral. L'anomenat selector quiral (SQ) serà l'encarregat de proporcionar aquest ambient per tal d'induir les diferències entre els dos enantiòmers. El mecanisme d'enantioseparació es fonamenta, doncs, en la formació d'un adsorbat diastereomèric transitori entre el SQ i cadascun dels dos enantiòmers basat en interaccions febles no-covalents entre les dues espècies. La diferent estabilitat dels dos adsorbats (SQ/enantiòmer) que es formen determina la separació [34]:



Es poden relacionar les diferents constants d'equilibri de formació dels dos adsorbats, K_{a_i} , amb la diferència d'energia lliure estàndard de Gibbs, ΔG_i° :

$$\begin{aligned} \Delta G_R^\circ &= \Delta H_R^\circ - T\Delta S_R = -RT\ln K_{aR} \\ \Delta G_S^\circ &= \Delta H_S^\circ - T\Delta S_S = -RT\ln K_{aS} \end{aligned} \quad (2)$$

Si arbitràriament es considera que $K_{a_R} > K_{a_S}$, la diferència entre els dos enantiòmers es pot expressar com:

$$\Delta\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{K_{a_R}}{K_{a_S}} \quad (3)$$

Per tant, si es fixa el SQ sobre una fase estacionària i es consideren només les interaccions entre el SQ i els analits, paràmetres cromatogràfics com els factors de capacitat (k_i) es poden expressar com a funció de les constants d'associació SQ/enantiòmer:

$$k_i = \frac{C_{FS}}{C_{FM}} \frac{V_{FS}}{V_{FM}} = K_{a_i} \frac{V_{FS}}{V_{FM}} \quad (4)$$

Si es torna a considerar que $K_{a_R} > K_{a_S}$, el factor de selectivitat (α) –el quocient entre dos factors de capacitat consecutius- es pot expressar tal i com:

$$\alpha = \frac{k_R}{k_S} = \frac{K_{a_R}}{K_{a_S}} \quad (5)$$

El factor de selectivitat (α) és una mesura de l'enantioselectivitat per un SQ i un parell d'enantiòmers determinats. Es pot mesurar en el cromatograma directament com:

$$k_i = \frac{t_i - t_0}{t_0} \quad (6)$$

Si es considera l'equació (5):

$$\alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} \quad (7)$$

On t_0 és el temps d'elució del marcador de volum mort, i 1 i 2 són l'enantiòmer menys retintut (menor K_a) i l'enantiòmer que elueix més tard (major K_a), respectivament. Aleshores, considerant (3):

$$\Delta\Delta G^\circ = -RT \ln \alpha \quad (8)$$

La qual cosa explica el gran èxit de la cromatografia enantioselectiva. Per a un parell d'enantiòmers, diferències de l'estabilitat dels adsorbats tan baixes com 121 J/mol resulten en una separació visible per HPLC de $\alpha=1,05$ [46].

2.5. Selectors quirals utilitzats en cromatografia líquida enantioselectiva [34]

Per tal de dur a terme cromatografia líquida enantioselectiva cal o bé una fase mòbil quiral o una fase estacionària quiral (FEQ). Una FEQ no és res més que una matriu sòlida, normalment sílice o alumina, en la qual s'hi ha incorporat -física o químicament- una molècula quiral, l'anomenat selector quiral (SQ). L'enllaç químic del SQ sobre la matriu cromatogràfica, quan és permanent, fa que la FEQ sigui una eina molt més robusta. Com a resultat de la fixació, la FEQ permet l'ús d'un ventall més ampli de condicions cromatogràfiques i la probabilitat d'assolir la separació desitjada s'incrementa. Un extens espectre de molècules i materials quirals han estat utilitzats com a SQs. De fet, les FEQs es classifiquen segons la naturalesa dels mencionats SQs.

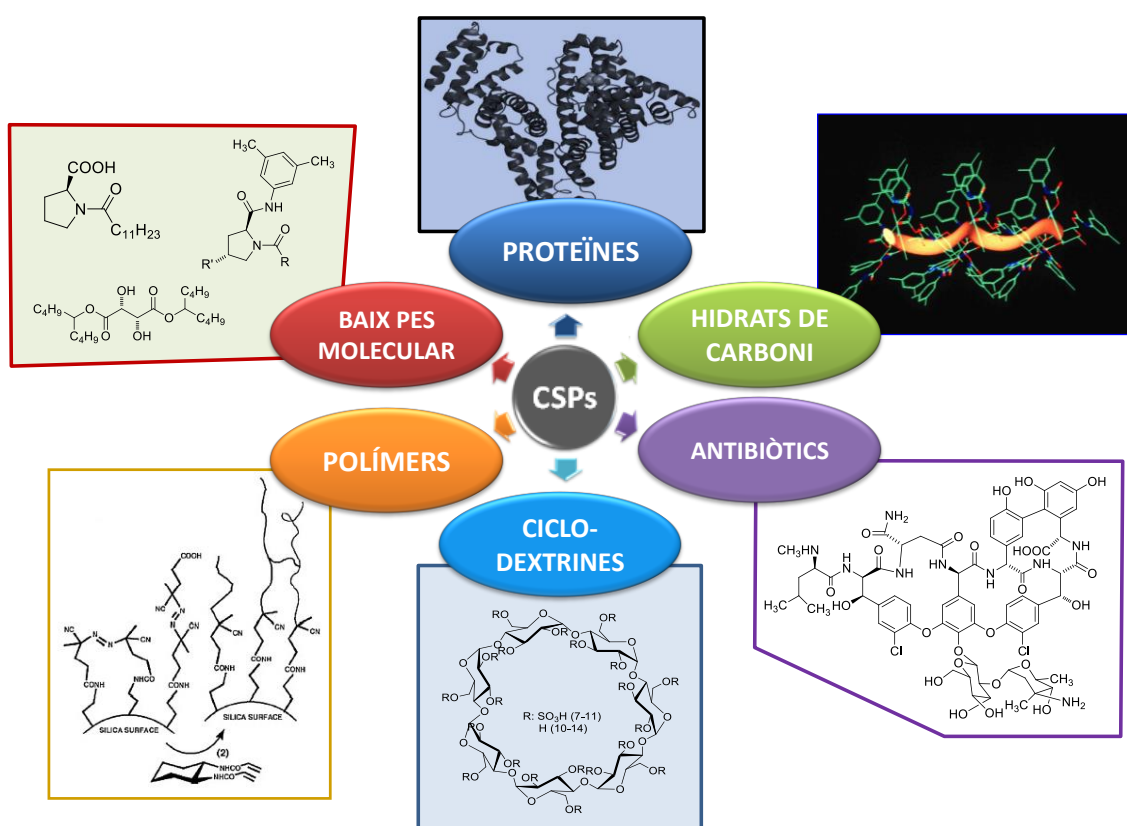


Figura 2.9. Les diferents famílies de FEQs classificades segons la naturalesa del SQ.

En el fons, la principal clau de l'èxit d'una separació enantiomèrica resideix en el simple fet de seleccionar la FEQ capaç de separar la mescla racèmica diana. Per tant, el coneixement de les FEQs existents i les seves propietats és de gran importància en aquest camp. Fins ara, un gran nombre de molècules quirals s'han desenvolupat i provat com a SQs (Taula 2.1). Actualment, més de cent FEQs estan comercialment disponibles, encara que menys d'una vintena d'aquestes són d'ús comú.

Taula 2.1. Els principals grups de selectors quirals (SQs) organitzats segons el seu origen i aplicables a diferents tècniques de separació[43]

Font	Tipus	Selector Quiral	Tècniques	Escala
Natural	Proteïnes	Sèrum d'Albúmina A		A
		Orosomucoide (α_1 glicoproteïna àcida)		A
		Ovomucoide	LC, CE, CEC	A
		Celobiohidrolasa I	Membranes, extracció	A
		Avidina A		A
		Quimotripsina A		A
		Ovotransferina		A
		α -, β -, γ -ciclodextrines,	LC, CE, CEC, GC, TLC,	A/P
	Oligosacàrids	Disacàrids,	cristal·lització	A
		Maltodextrines	CE	A
			CE	
	Polisacàrids	Celulosa		A
		Amilosa	CE	A
		Midó		A
		Dextrà		A
		Heparina	CE	A
		Pectines	CE	A
	Antibiòtics	Vancomicina		A/P
		Teicoplanina	LC, CE, GC	
		Ristocetina	SFC	
		Avoparcina		
	Molècules de baix pes molecular	Aminoàcids	LC, CE, SFC	
		Àcids còlics	Cristal·lització	
		Alcaloides		
		Àcids tàrtrics		
Semisintètic	Oligosacàrids modificats	Derivats ciclodextrines	LC, CE, CEC, GC, TLC	A/P
		Polímers de ciclodextrines	CE	A
	Polisacàrids modificats	Carbamats de polisacàrids	LC, CE, SFC, TLC, extracció i membranes	A/P
		Èsters de polisacàrids		
	Sulfats de polisacàrids	Sulfat de dextrà	CE	
		λ -carragenina	CE	
		Derivats de condroïtina	CE	
	Derivats de les molècules de baix pes	Selectors de bescanvi iònic	LC, CE, CEC, SFC, extracció	A/P
Sintètics	Molècules de baix pes molecular sintètiques	Selectors tipus Pirkle	LC, CE, GC, TLC, SFC, membranes	A/P
			LC, CE, extracció i cristal·lització	A
	Selectors LEC (bescanvi iònic)	Èters corona	LC, CE, extracció	A/P
		Derivats de prolina	LC, CE, TLC, extracció, membranes	A/P
	Polímers sintètics helicoïdals	Policacrilamides	LC, CE, SFC	A/P
		Poliacrilats		A/P
		Tartramides	LC	A/P
		entrelligades	LC, CE, SFC, membranes	A

2.6. Pèptids

Les proteïnes i els pèptids estan constituïts per aminoàcids quirals. Per tant, tenen la capacitat intrínseca potencial de discriminar els enantiòmers d'una molècula quiral [47]. La unió entre aquests aminoàcids es realitza mitjançant un l'anomenat enllaç peptídic, fet que provoca que l'estructura dels pèptids i de les proteïnes vingui principalment determinada per la geometria plana i rígida d'aquest enllaç amida. La deslocalització per ressonància del parell d'electrons de l'àtom de N en el grup carbonil (Figura 2.8.a) donen a l'enllaç peptídic un caràcter parcial (60%) de doble enllaç, característica que es reflecteix en una llargada sensiblement inferior (1,32 Å) a la de l'enllaç simple C-N (1,49 Å). Aquesta estabilització inhabilita la lliure rotació de l'enllaç i força als quatre àtoms integrants (C, O, H, N) a compartir un mateix pla. Això fa que l'esquelet del pèptid estigui format per una sèrie de plans separats per grups metilens substituïts (Figura 2.8.b), on l'O del carbonil i l'H de l'amida es troben en posició *trans*, un en cada extrem del pla, mentre que la resta d'enllaços simples (N-C i C-C) permeten rotació. Així doncs, la torsió d'aquests enllaços és la que determina l'orientació relativa entre plans, que es mesura amb els angles diedres Φ (enllaç N-C $^{\alpha}$) i Ψ (enllaç C $^{\alpha}$ -C') (Figura 2.8.c). El valor d'aquests angles determina d'una manera absoluta la conformació global d'un pèptid, encara que només unes poques combinacions d'angles són estèriament possibles en l'estructura secundària de les proteïnes.

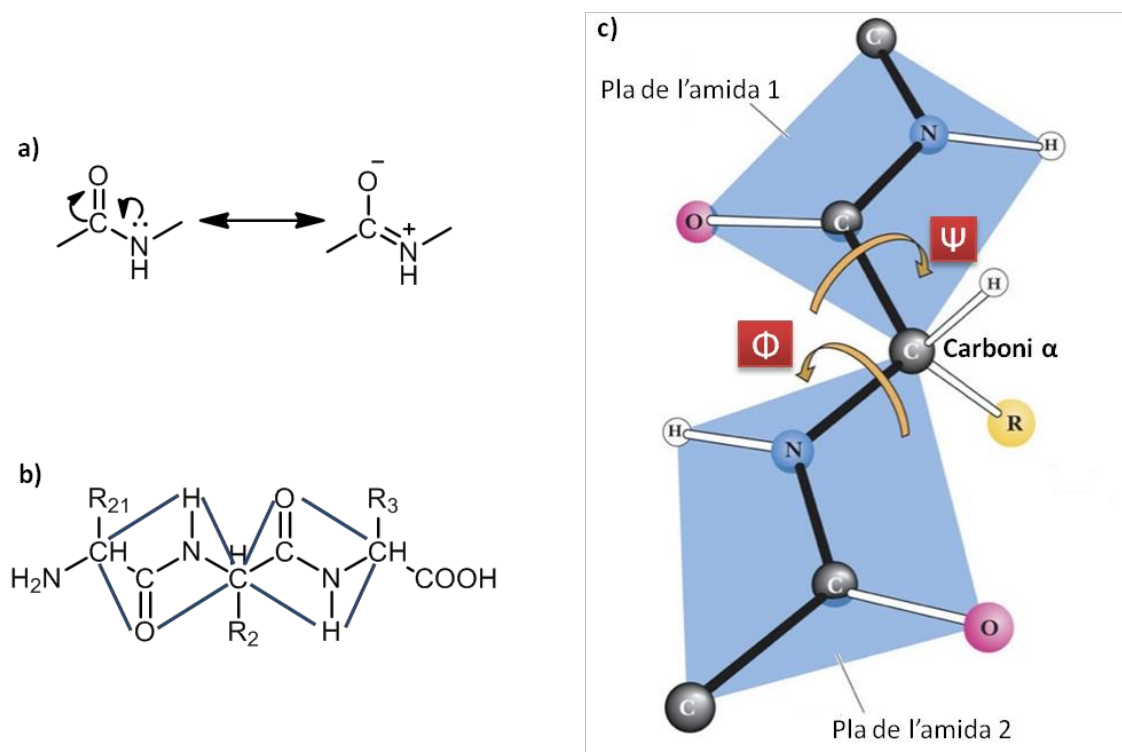


Figura 2.10. Representació de l'estructura d'un dipèptid. S'indiquen els angles diedres responsables de la geometria de pèptids i proteïnes [48].

2.7. Prolina

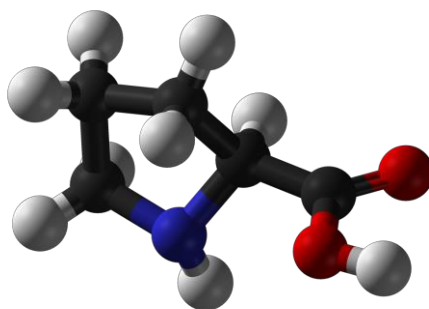


Figura 2.11. Representació de l'estructura de l'aminoàcid L-prolina [49].

La L-prolina (Figura 2.11) és un aminoàcid hidròfob i no essencial ja que l'organisme és capaç de sintetitzar-lo a partir d'un altre aminoàcid, el L-Glutamat. La singularitat de la L-prolina és que és l'únic aminoàcid proteïnogènic que conté una amina secundària. Aquesta estructura distintiva de la cadena lateral de l'aminoàcid li dona a la prolina una rigidesa conformacional excepcional comparada amb altres aminoàcids [50]. Tot això fa que la seva participació en l'estructura clàssica de les proteïnes sigui limitada, no només per la distorsió estructural que comporta, sinó perquè, un cop participa en enllaços peptídics, li manca un protó amida. Així, quan la prolina intervé en un enllaç peptídic, el seu propi nitrogen no està enllaçat a cap hidrogen. Per tant, no pot actuar com a grup donador d'enllaços d'hidrogen, encara que sí pot actuar com a grup acceptor. Conseqüentment, aquest fet afecta la geometria del pèptid en el que intervé.

2.7.1. Rigidesa i restricció conformacional

La prolina és un aminoàcid que no encaixa amb facilitat en les estructures secundàries periòdiques clàssiques. Un dels motius és la rigidesa imposada pel cicle de pirrolidina que limita el seu propi espai conformacional accessible. Degut a que l'anell de 5 membres conté dos àtoms de la cadena principal del pèptid (el N i el C^α), la rotació sobre aquest mateix enllaç (N-C^α) està molt restringida. Aquest fet provoca que s'associï a la prolina el caràcter de disruptor d'estructures secundàries regulars. Comunament, la prolina es pot trobar o bé com a primer residu, o bé, formant part de les estructures hèlix α encara que en distorsiona els valors conformacionals típics. També pot formar part dels marges de les làmines β , i és molt freqüent en estructures no periòdiques com els girs. Així doncs, aquestes disposicions determinen que la prolina estigui normalment exposada al dissolvent, tot i contenir una cadena lateral totalment alifàtica.

Per altra banda, una altra característica fonamental de l'aminoàcid és el volum de l'anell de pirrolidina que afecta a la conformació que poden adoptar els aminoàcids

immediats. De fet, el grup $C^{\delta}H_2$ pot impedir estèriament el grup R de l'aminoàcid anterior (Figura 2.12), obligant a aquest a adoptar angles Psi (Ψ) propis d'estructura β .

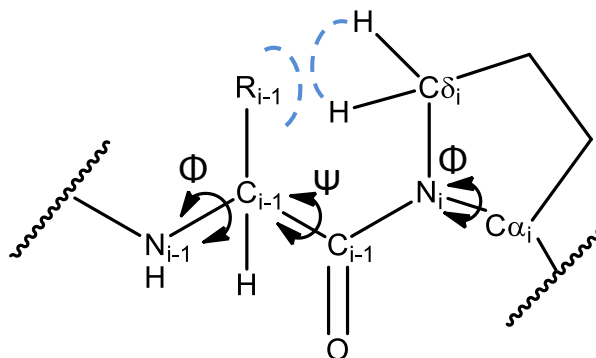


Figura 2.12. Representació de l'estructura de l'aminoàcid L-prolina [51].

A més a més, com que Ψ de la prolina està fix aproximadament a -65° , el dipèptid resultant tendeix a ser bastant rígid, fet que encara s'accentua més si es tracta d'un dipèptid format per dues prolines.

2.7.2. Isomerització *cis-trans* dels enllaços AA-Pro

Tal com s'ha explicat, els enllaços peptídics solen presentar un notable caràcter de doble enllaç que adopta espontàniament una disposició *trans* per tal d'evitar l'impediment estèric entre els grups funcionals del C^{α} [52]. De fet, gairebé el 99.97 % d'enllaços peptídics en proteïnes plegades es troben en disposició *trans* (Figura 2.13). Tanmateix, com que la prolina és l'únic aminoàcid d'origen natural amb l'amina secundària, en intervenir en enllaços peptídics pot exhibir les dues configuracions de l'enllaç peptídic, *cis* i *trans*, que en aquest cas són energèticament similars (la forma *trans* és 0,6 kcal/mol més favorable) [53–55]. Com que les formes *cis* i *trans* dels dipèptids AA-Pro són isoenergètiques, les cadenes peptídiques curtes exhibeixen una mescla de formes *cis* i *trans* on la població *cis* incrementa en canviar des d'un dissolvent polar a un apolar [56].



Figura 2.13. Disposicions *trans* i *cis* de la L-prolina.

Conseqüentment, els esquelets peptídics que contenen regions riques en prolina poden isomeritzar, i per tant, tenen l'habilitat de poblar estats conformationals i dinàmics discontinus separats per una modesta energia d'activació d'interconversió

[53]. Les dades disponibles per pèptids de llargada curta indiquen que la isomerització del prolil es produeix mitjançant un mecanisme d'una sola etapa amb un estat de transició planar (Figura 2.14) i xifren el valor de la barrera d'interconversió entre l'enllaç amida dels confòrmers en unes 14-24 kcal/mol [53]:

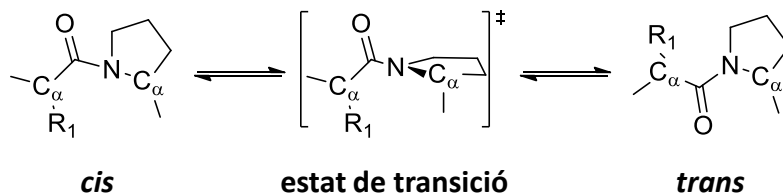


Figura 2.14. Isomerització del residu prolil en un pèptid mitjançant un mecanisme d'una sola etapa [53].

D'aquesta manera, encara que la isomerització *cis/trans* al voltant de l'enllaç peptidil-prolil amida estigui permesa, la considerablement elevada barrera energètica limita la interconversió. Tot i així, la taxa d'interconversió és dependent del dissolvent, sent més alta en dissolvents apolars [57].

2.7.3. Conformació de la cadena lateral del residu de prolina

El comportament conformacional dels aminoàcids és d'especial interès perquè determina la funcionalitat específica de les proteïnes i polipèptids. La prolina, com ja hem dit, constitueix una excepció degut a la significativa constricció de la seva flexibilitat conformacional. Estudis teòrics sobre L-prolina demostren que 4 confòrmers tenen poblacions notables (Figura 2.15) [58,59]. Els confòrmers dels tipus I i II tenen poblacions al voltant del 63 i 37% respectivament. No obstant, com es pot apreciar en la figura, aquests confòrmers estan estabilitzats per enllaços de hidrogen intramoleculars, els I de tipus N···H-O i, els II de tipus N-H···O [59].

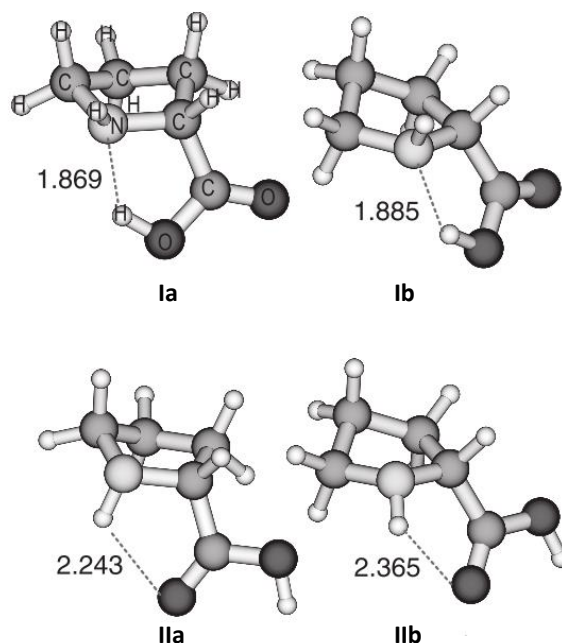


Figura 2.15. Confòrmers de la D-prolina amb les distàncies intramoleculars dels enllaços per pont d'hidrogen (A) [59].

De la mateixa manera, els anells de pirrolidina de les prolines en cadenes peptídiques no són plans, sinó que poden adoptar dues conformacions d'especial rellevància i pràcticament isoenergètiques [54]. En aquestes conformacions tots els àtoms de l'anell de 5 membres estan en un mateix pla, excepte el C^γ que sobresurt. En la conformació C^γ -exo, l'àtom C^γ i el grup carbonil es troben en costats diferents del pla delimitat per quatre dels àtoms de l'anell de pirrolidina, mentre que en la conformació C^γ -endo es troben al mateix costat (Figura 2.16).

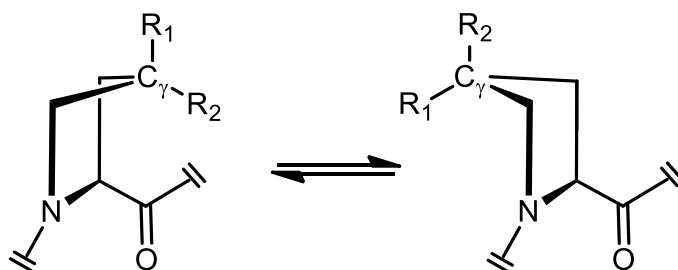


Figura 2.16. Representació de l'equilibri entre els dos confòrmers (endo i exo) de la cadena lateral de l'anell de prolina [60].

2.8. Cadenes de poliprolina

Les estructures tradicionalment més comunes en les proteïnes, i per tant, les més conegudes, són estructures secundàries repetitives com ara l'hèlix α i les làmines β , i la no tant corrent hèlix 3_{10} , encara que qualsevol estructura permesa i que repeteixi els angles diedres Φ , Ψ (i ω) resultaria en una estructura helicoidal. De fet, alguns autors

han descrit algunes hèlices estereoquímicament permeses, com ara l'hèlix π o l'hèlix α levogira, per bé que cap d'elles és habitual trobar-la en les proteïnes.

Durant els anys 50, es va determinar l'estructura d'una proteïna fibrosa com és el col·lagen. Inesperadament, durant el seu estudi, es va observar que contenia una triple estructura helicoïdal levogira, molt rica en seqüències abundants en prolina i hidroxiprolina. Aquest fet va centrar un nou interès en les cadenes curtes d'aquest aminoàcid. Els càlculs conformacionals teòrics mostraven que aquests pèptids tenien mínims energètics, un dels quals corresponia a la *trans*-prolina [61] que formava cadenes helicoïdals levogires (poliprolina II, PPII) definides com: $\Phi=-75$, $\Psi=145$, $\omega=180$, $n=3$ (Figura 2.17.b); valors molt similars als de l'hèlix tipus col·lagen. L'altre mínim corresponia a la poliprolina I (PPI) [62], formada per *cis*-prolina ($\omega=0$) (Figura 2.17.a), en una estructura helicoïdal dextrogira amb valors tal i com: $\Phi=-75$, $\Psi=160$, $n=3,3$.

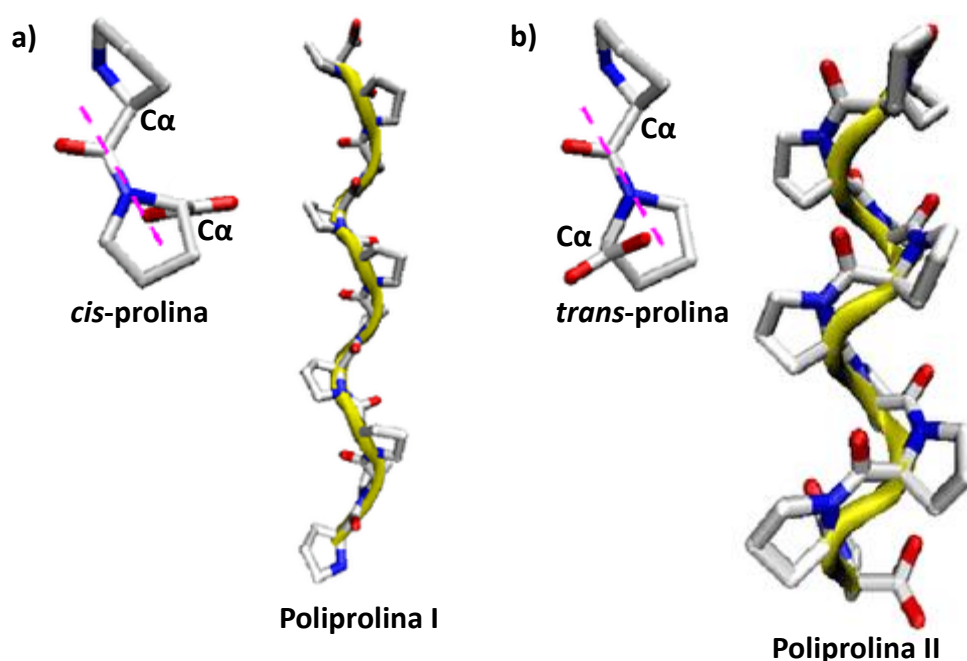


Figura 2.17. a) Estructura de la *cis*-prolina i la PPI [63]. b) Estructura de la *trans*-prolina i la PPII [63].

Taula 2.2. Paràmetres geomètrics en PPI, PPII i hèlix α .

Tipus d'hèlix	Φ	Ψ	Ω	n	r	p	Enllaç d'H
PPI	-75	160	0	3,3	1,7	5,6	-
PPII	-75	145	180	-3,0	3,1	9,3	-
α	-57,8	-47	180	3,6	1,5	5,5	i,i + 4

On n és el nombre de residus per gir helicoïdal, valors positius signifiquen un gir dextrogir, valors negatius signifiquen un gir levogir, r és l'altura de cada gir (Å) i p és la inclinació helicoïdal (Å/gir).

2.8.1. Poliprolina II

En anys recents, l'hèlix de poliprolina II ha emergit clarament com una classe estructural no només en proteïnes fibroses com el col·lagen, sinó també de proteïnes plegades i desplegadas. Tot i que, com s'ha mencionat anteriorment, és molt menys abundant que les tradicionals estructures hèlix- α i làmina β , l'hèlix de poliprolina II representa també una estructura natural comuna exceptuant les dues anteriors. De fet, s'ha demostrat que l'estructura PPII no només posseeix una funció estructural, sinó que també afavoreix les interaccions proteïna-proteïna i proteïna-àcid nucleic i juga un rol rellevant en la transducció de senyals i en l'assemblatge de complexos proteics. Aquest fet ve corroborat per que habitualment es troba l'estructura en els llocs d'unió entre proteïnes, especialment en aquells on la predominança de dominis SH3 és majoritària. Això vol dir que la PPII té una indiscutible preferència per la prolina, però gairebé qualsevol aminoàcid natural pot trobar-se en aquesta conformació. En canvi, la formació de l'hèlix PPI només és possible gràcies als residus de Pro, per la seva conformació *cis*.

La conformació PPII és una hèlix levogira, amb tots els enllaços peptídics en disposició *trans*, que es defineix pels angles diedres característics (Φ , Ψ , ω)=(-75°, 145°, 180°). Cada volta de PPII conté exactament 3 residus, significativament menys que els 3,6 de l'hèlix- α . Això fa que la conformació PPII sigui considerablement més expandida, ocupant cada residu 3,12 Å, molt més que els 1,5 Å per residu d'una hèlix- α (Taula 2.2). Així doncs, i gràcies a aquests 3 residus per volta ($n=3$), la PPII té una simetria rotacional terciària o de tres punts (*3-fold rotational symmetry*) i la forma d'un prisma triangular. Totes aquestes característiques permeten incloure a l'hèlix PPII en el grup de les estructures proteiques esteses juntament amb la làmina β i la no tan freqüent cadena β .

L'hèlix PPII no admet patrons regulars intracatenaris de ponts d'hidrogen, tot i que un nombre limitat d'enllaços d'hidrogen es poden formar entre la cadena i molècules d'aigua i entre la cadena principal i la cadena lateral del residu de l'aminoàcid. Encara que la llibertat conformacional de la PPII pot quedar parcialment limitada quan inclou prolina degut al seu anell de pirrolidina, l'hèlix estesa de PPII és notablement més flexible en comparació a l'hèlix- α o la làmina β (Figura 2.18). Degut a aquestes propietats conformacionals de la prolina, s'ha suggerit que l'estructura PPII és també una conformació dominant en l'estructura de les regions riques en prolina de les proteïnes [64].

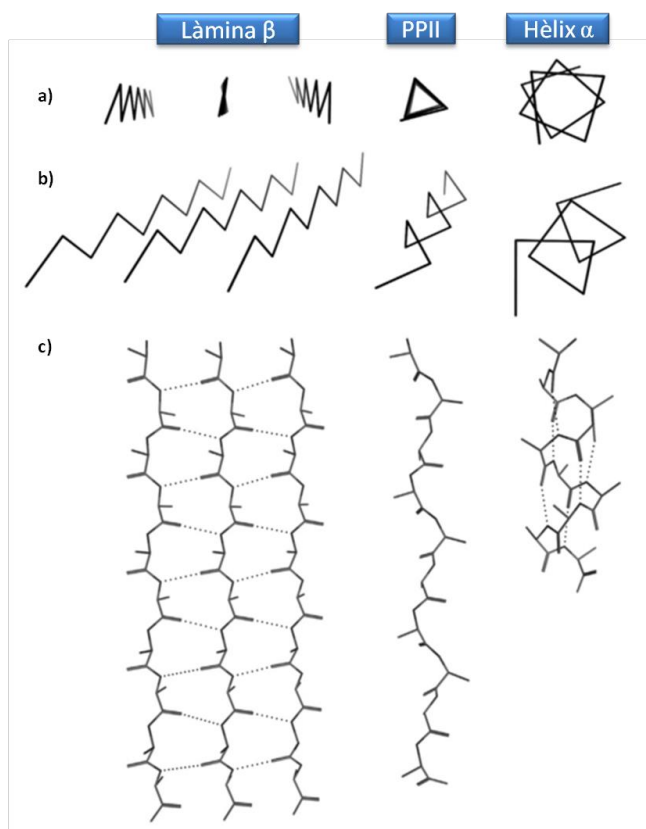


Figura 2.18. Les estructures periòdiques majoritàries ideals [64]. a) Modelades com la “CA-trace” projecció axial helicoidal. b) Perspectiva d’aquesta projecció. c) i com una cadena de 10 aminoàcids d’alanina.

2.8.2. Poliprolina I

L’hèlix de poliprolina I és una estructura molt més densa que la seva anàloga PPII degut a la disposició *cis* dels seus enllaços peptídics (Figura 2.19). També és molt menys prevalent que la PPII ja que com s’ha explicat, l’isòmer *cis* és d’una energia lleugerament superior al *trans*, i per tant, queda desafavorit energèticament. Els seus angles diedres típics (Φ , Ψ , ω)= $(-75^\circ, 160^\circ, 0^\circ)$ són similars, però no idèntics, als de l’hèlix PPII. Tanmateix, l’hèlix PPI és de naturalesa dextrogira i molt més compactada, ja que aproximadament conté 3,3 residus per volta (enlloc de 3). Com que està més comprimida, cada residu ocupa només 1,9 Å. Una vegada més, no s’estableixen enllaços d’hidrogen interns, no només per l’absència de protons en l’amida, sinó també perquè els àtoms de nitrogen de l’amida i l’oxigen estan molt distants (aproximadament 3,8 Å) i orientats cap a l’interior de l’estructura.

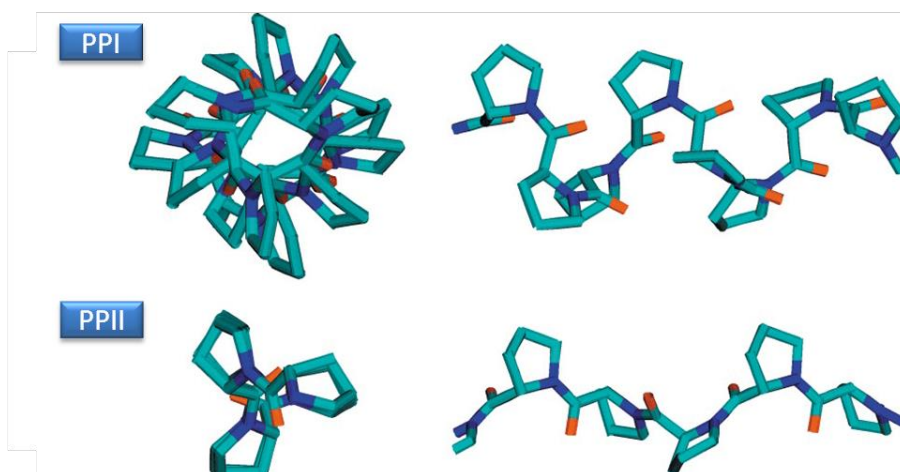


Figura 2.19. Perspectiva lateral i alçat de les conformacions del pèptid de poliprolina [65].

2.9. Fases estacionàries quirals tipus poliprolina

2.9.1. Antecedents: Ús de prolina com a fase estacionària quiral

Les aplicacions d'aquest aminoàcid són força diverses. No obstant, tant la seva naturalesa quiral, com les peculiaritats àmpliament comentades fan que aquesta molècula sigui considerada una candidata ideal per ser emprada com a constituent de SQs. De fet, el seu ús es remunta als anys 80, quan es va utilitzar per primera vegada com a SQ en cromatografia de bescanvi iònic [66] (Figura 2.20.a).

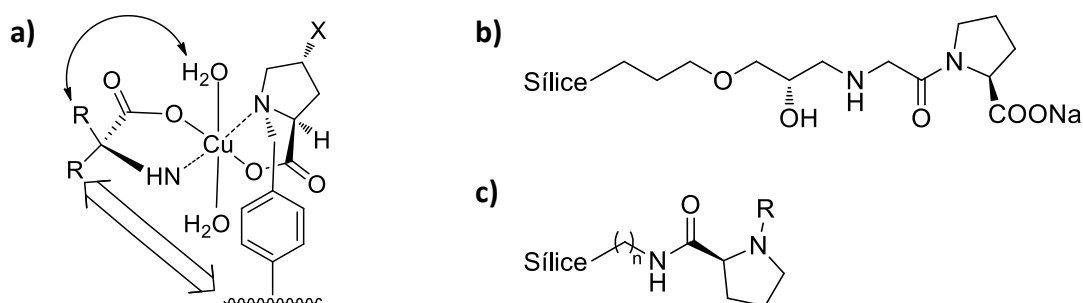


Figura 2.20. a) Derivat de prolina usat com a FEQ en cromatografia de bescanvi iònic [66]. b) FEQ descrita per M. Ohwa, M. Akiyoshi, S. Mitamura [67]. c) Estructura tipus de les FEQs descrites per C. Daban Haurou i col·laboradors [68].

No obstant, la seva aplicació com a SQ en cromatografia líquida convencional (FN) no es va produir fins a l'any 1990. Aleshores, es va plantejar la utilització de L-prolina unida covalentment sobre gel de sílice. Així doncs, Ohwa i col·laboradors foren els primers en descriure la separació per HPLC en fase normal dels enantiòmers d'alguns fàrmacs β -agonistes mitjançant una FEQ derivada de L-prolina (Figura 2.20.b) [67]. L'efecte dels dissolvents emprats en la fase mòbil i els modificadors addicionats a aquesta ja va resultar objecte de gran interès. En aquest tipus de FEQs la prolina es trobava unida a la matriu cromatogràfica mitjançant el seu extrem amino, deixant

lliure el grup carboxilat. Estudis posteriors van centrar-se en FEQs en les que el SQ estava unit a la matriu cromatogràfica mitjançant el grup carboxilat, deixant lliure l'extrem amino (Figura 2.20.c) [68]. Encara que aquestes darreres van aconseguir resoldre aminoàcids que contenen anells aromàtics π -deficients, els factors de separació eren inferiors a les FEQs del grup de M. Ohwa.

Tanmateix, foren Pirkle i col·laboradors els que varen popularitzar l'ús de L-prolina com a part fonamental de FEQs de baix pes molecular [69–73]. A principis dels anys 90, s'estava produint un extens desenvolupament i preparació de diferents famílies de FEQs, fins aquell moment molt limitat. El tema gaudia de gran interès i d'especial rellevància com tot allò relacionat amb l'enantioselectivitat, els progressos en els procediments enantioselectius en síntesi asimètrica inclosos. L'anàlisi cromatogràfica d'enantiòmers s'albirava com una tècnica capaç de poder determinar de forma precisa la puresa enantiomèrica que hauria d'ajudar la síntesi enantioselectiva. Conseqüentment, una part significativa dels esforços de Pirkle i col·laboradors en aquest camp es van centrar en investigacions mecanístiques sobre l'enantiodiscriminació. Així arribaren a dissenyar FEQs específiques per analits diana determinats [70,72]. El grup del professor Pirkle va dissenyar noves FEQs de les anomenades de múltiple interacció amb els analits. Entre elles es van descriure derivats de la *N*-(acil)prolina-3,5-dimetilanilida capaços de discriminar els enantiòmers d'esters i amides de la *N*-(3,5-dinitrobenzoil)leucina (Figura 2.21.a). En un dels casos, les FEQs descrites (Figura 2.21.a) van mostrar factors de separació (α) extraordinàriament elevats ($30 < \alpha < 80$) en la separació de diferents amides de l'*N*-(3,5-dinitrobenzoil)leucina racèmica (Figura 2.21.b) [72].

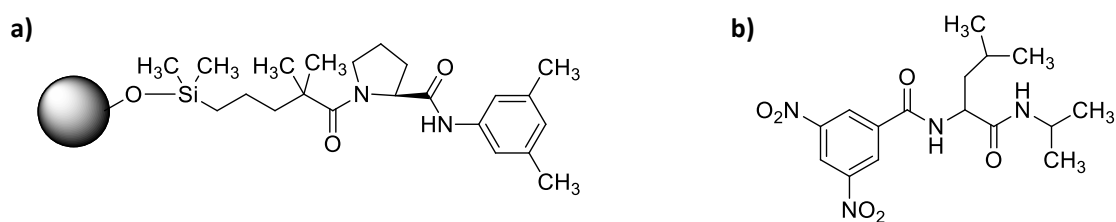


Figura 2.21. FEQ derivada de L-prolina (a) que origina valors d'enantioselectivitat anormalment elevats per a la separació d'amides de *N*-(3,5-dinitrobenzoil)-(\pm)-leucina (b) [72].

Amb l'arribada de la química combinatòria al final de la dècada dels 90, es va intentar aplicar les mateixes tècniques en la selecció de nous SQs que mostressin alts valors d'enantioselectivitat. D'aquí cal destacar un estudi realitzat pels professors Svec i Fréchet [74] on s'avaluava l'enantioselectivitat de possibles selectors quirals que consistien en amines derivades de prolina, valina i fenilalanina front a quatre racèmics derivats de *N*-(3,5-dinitrobenzoil)leucina. En aquest estudi, els derivats de prolina, concretament, l'*L*-prolina-1-indanamida resultaren ser els més enantioselectius, assolint factors de separació molt elevats pels analits assajats ($\alpha > 23$) (Figura 2.22). Tot

això va generar un gran interès en l'ús de prolina, o de diverses unitats de la mateixa, com a SQ.

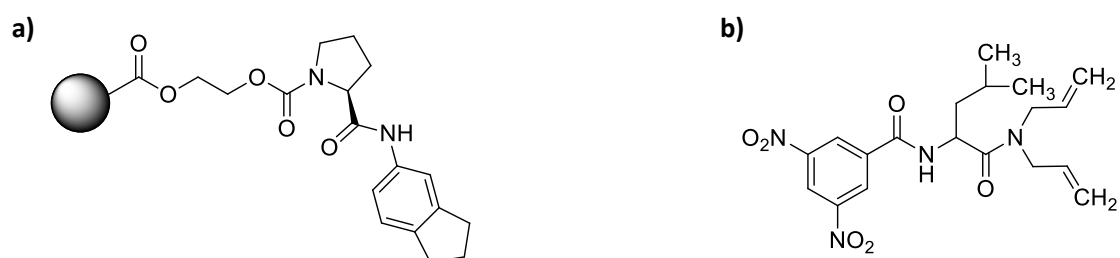
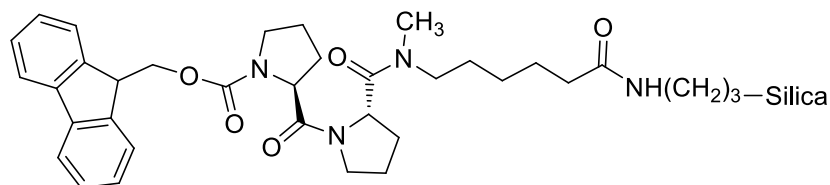


Figura 2.22. FEQ i analit racemic que assoleixen una $\alpha > 23$ [74]. a) FEQ derivada de L-prolina-1-indanilida. b) Dial·lilamida de la 3,5-dinitrobenzoïlleucina.

2.9.2. Fases estacionàries quirals derivades d'oligoprolines

El grup de Li va publicar una sèrie de FEQs basades en oligopèptids de prolines (Figura 2.23) i les va comparar amb els corresponents anàlegs d'una o dues unitats d'un altre aminoàcid com valina [75]. Mentre que una FEQ tipus monoproline era capaç de resoldre 4 dels 53 analits de la sèrie testada, la FEQ que contenia el dipèptid anàleg en resolvia 19, i la corresponent al tetràmer 31. A més a més, els factors de separació incrementaven com més residus de prolina contenia la FEQ. Aquestes observacions demostraven la importància d'utilitzar pèptids de l'aminoàcid prolina, enlloc de qualsevol altre escollit a l'atzar, ja que degut a l'estructura de la prolina, la conformació dels pèptids que forma pot ser única.



Fmoc-Pro-Pro-(Me)N-(CH₂)₅-CO-NH(CH₂)₃Silica
 Fmoc-Pro-Pro-HN-(CH₂)₅-CO-NH(CH₂)₃Silica
 Fmoc-Pro-Pro-Pro-Pro-(Me)N-(CH₂)₅-CO-NH(CH₂)₃Silica
 Fmoc-Pro-Pro-(Et)N-(CH₂)₅-CO-NH(CH₂)₃Silica
 Fmoc-Pro-Pro-(n-Pr)N-(CH₂)₅-CO-NH(CH₂)₃Silica
 Fmoc-Val-Val-(Me)N-(CH₂)₅-CO-NH(CH₂)₃Silica

Figura 2.23. Primeres FEQs estudiades per Li i col·laboradors [75] basades en pèptids curts de prolina.

A més a més, segons els autors, les columnes es podien utilitzar en una gran varietat de dissolvents orgànics d'ús comú en cromatografia de fase normal, incloent els clorats com el DCM i el CHCl₃, observacions que seran extensament comentades al llarg de la present tesi doctoral. El mode polar orgànic també era eficaç per aquestes enantioseparacions, però en general era considerat massa polar pels analits provats.

No obstant, aquestes FEQs presentaven un problema essencial ja que posseïa un fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc), un protector sintètic, com a grup terminal, un vestigi de l'origen comú del reactiu emprat amb els utilitzats en fase sòlida. El grup Fmoc és ric en electrons π i això impedia la correcta interacció amb els analits que continguessin anells aromàtics de caràcter també electrodonador. A més a més, aquest grup és làbil en front d'una majoria de bases orgàniques, fet que limitava l'ús d'aquestes columnes a compostos neutres i/o àcids.

Per aquests motius, el mateix grup va iniciar un estudi d'aquest tipus de FEQs reemplaçant el Fmoc com a grup terminal [76]. Així doncs, Li i col·laboradors van dissenyar i preparar 8 nous SQs que es van avaluar en fase normal per tal de millorar l'eficàcia d'aquestes noves FEQs (Figura 2.24).

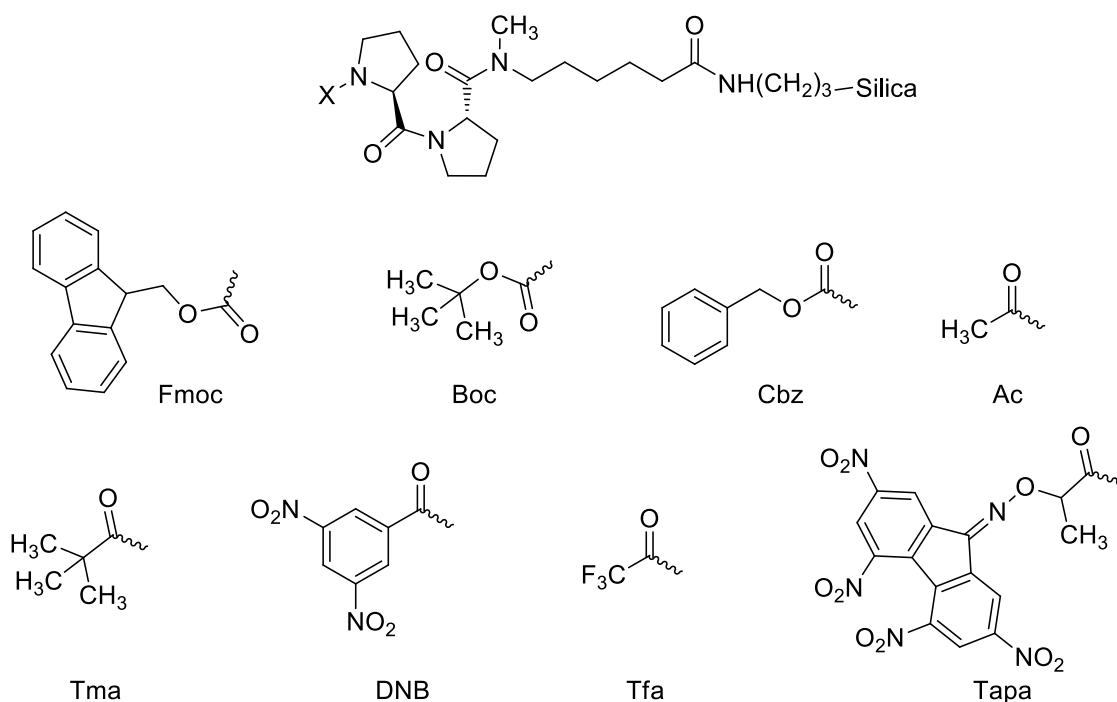


Figura 2.24. FEQs estudiades per Li i col·laboradors [76] canviant el grup terminal de la FEQ.

Malgrat que el Boc i el Cbz van millorar notablement l'enantioselectivitat obtinguda amb la FEQ-Fmoc, el seu principal inconvenient era la inestabilitat en medi àcid. Totes les FEQs amb un grup terminal acil mostraren una alta capacitat d'enantioselectió. D'entre elles, la que contenia el trimetilacetil (Tma) va demostrar ser significativament més enantioselectiva. Dels 53 analits provats, la FEQ amb el grup Tma fou capaç de resoldre'n 39, superant àmpliament la FEQ-Fmoc, amb 19 analits resolts, així com també una columna comercial provada amb la mateixa sèrie d'analits, i àmpliament utilitzada, la Whelk-O2, que només va ser capaç de resoldre'n 26 de la sèrie.

No obstant això, cal mencionar que molts dels analits separats tenien característiques estructurals molt semblants entre sí, on sobretot hi abundaven molts anells aromàtics tal i com biarils o binaftils, fet que implica atropoisòmers (Figura 2.25.a). Degut a que gairebé tots els compostos racèmics que no posseïen un grup donador de ponts d'hidrogen no foren resolts, la hipòtesi que els enllaços d'hidrogen jugaven un rol fonamental en l'enantioreconeixement va començar a aflorar, tot i que els autors no en fan esment. A més a més, en els compostos on el grup donador de ponts d'hidrogen (-OH o -NH_x) es trobava massa distant del centre o eix estereogènic (Figura 2.25.a), tampoc s'hi observava enantioseparació. No obstant, la resolució de la base de Tröger (Figura 2.25.b) semblava indicar que una interacció polar era suficient per introduir reconeixement enantioselectiu en el sistema.

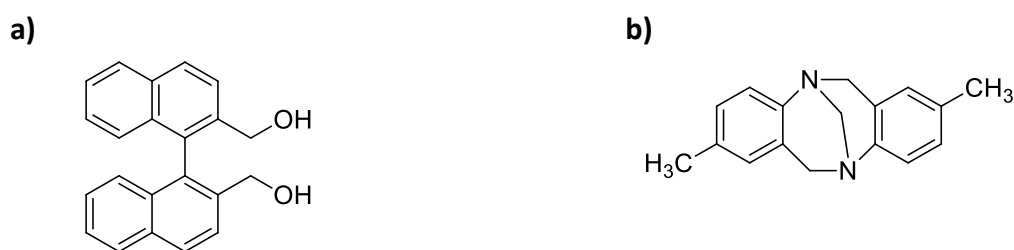


Figura 2.25. a) 1,1'-binaftil-2,2'-dimetanol. Atropoisomers que no es poden resoldre degut a la distància entre el grup donador d'hidrogens (-OH) i l'eix quiral. b) Base de Tröger. Analit resolt tot i no contenir grups donadors de ponts d'hidrogen.

La recerca va continuar en la direcció d'investigar la llargada del pèptid [77]. Tal i com ja s'ha comentat, els factors de separació incrementaven a mesura que el nombre de prolines que el pèptid contenia també ho feia. Tot i que en aquell moment no se'n va fer esment, aquesta dependència en el nombre de residus prolil es podia atribuir a l'estructura secundària dels pèptids, ja que aquesta és més pronunciada com més llarga és l'oligoprolina. Com ja s'ha comentat, una de les principals dificultats de les FEQs tipus oligoprolina és que no acaben de resoldre els compostos que no contenen grups donadors d'hidrogen. Per aquest tipus de compostos, les interaccions d'atracció entre l'analit i el SQ només es poden aconseguir per mitjà de forces de Van der Waals (dipol/dipol, dipol induït/dipol i forces de dispersió), típicament molt més dèbils que els ponts d'hidrogen. En el cas de la decaprolina, aquestes interaccions semblen ser suficients per tal de proporcionar un cert mecanisme d'enantioreconeixement en aquest sistema.

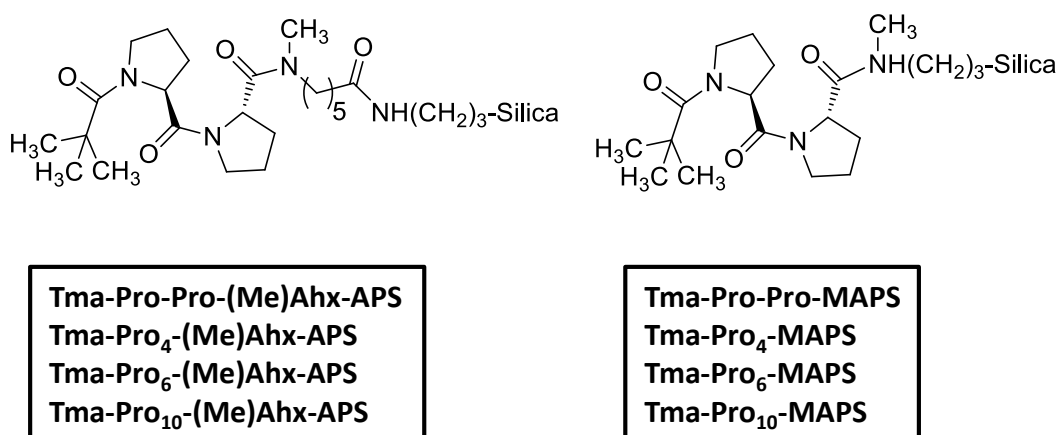


Figura 2.26. FEQs estudiades per Li i col·laboradors [77] canviant el nombre d'unitats de prolina de l'esquelet peptídic i la llargada de l'espaiador.

En el mateix estudi, els *linkers* o espaiadors que uneixen el SQ amb el suport sòlid (sílice gel) també foren avaluats [77] (Figura 2.26). Quan els SQs tipus oligoprolina estan directament units al gel de sílice, sense un espaiador llarg, la seva habilitat per resoldre mesclures racèmiques es veu augmentada. A més a més, les FEQs estudiades pel grup de Li continuaven sent estables en tots els dissolvents orgànics d'ús habitual, incloent el DCM i el CHCl_3 , encara que la seva aplicabilitat en fase inversa semblava limitat.

Contemporàniament a les investigacions del Dr. Li, el grup de la Dra. Minguillón ja havia iniciat un projecte en la recerca de SQs tipus poliprolina. La gran enantioselectivitat que havia demostrat aquest aminoàcid en diferents estudis i el fet que les cadenes de poliprolina fossin estructures helicoidals flexibles capaces de modificar la seva conformació segons el dissolvent en el qual es troben immerses havia atret la nostra atenció. Per altra banda, el nostre laboratori ja gaudia d'una basta experiència en la recerca de SQs de la família dels carbohidrats [78–83], que posseeixen un element vertebrador hidrocarbonat helicoidal el qual s'ha modificat químicament introduint diferents grups aromàtics, els arilcarbamat d'amilosa i cel·lulosa (Figura 2.27).

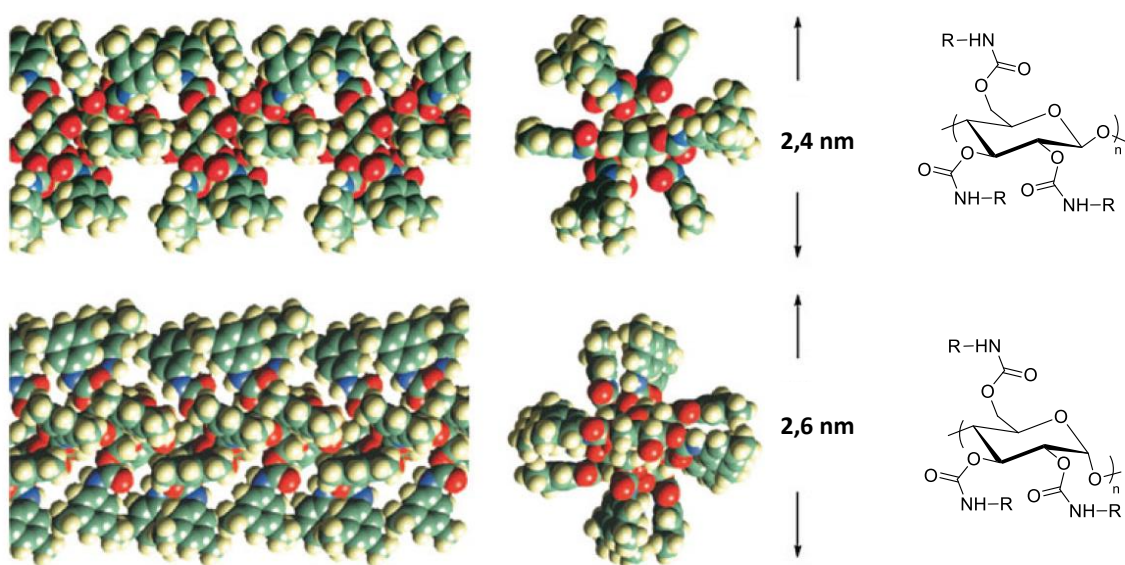


Figura 2.27. Estructures dels carbamats de cel·lulosa (part superior) i amilosa (part inferior). Estructures optimitzades al llarg de l'eix (esquerra) de la tris(3,5-dimetilfenilcarbamats) de cel·lulosa i d'amilosa i estructures perpendiculars a aquest mateix eix (part central) [84]. Estructura química general d'aquests polímers (dreta) [85].

En aquest context, les investigacions del grup es van dirigir a emular els derivats dels polisacàrids utilitzant com esquelet central l'estructura helicoidal d'un polipèptid format per unitats de prolina. Atés que estava descrit que era necessari un mínim de 5 o 6 prolines per tal de formar una hèlix estable tipus PPII [86], per això es va idear una cadena de 8 monòmers. També amb la idea de mimetitzar els carbohidrats, es va introduir un anell aromàtic a la posició 4 de cada anell de pirrolidina [87], obtenint una molècula de poli-(4R)-(3,5-dimetilfenil)aminocarboniloxi-L-prolina (**SQ2**, Figura 2.28). Aquests anells aromàtics introduïts podien aportar la capacitat d'establir interaccions electròniques amb els analits que la poliprolina sense substituir no tenia. Al mateix temps, es va preparar un SQ tipus Pirkle que contenia una sola unitat terminal (**SQ1**). L'espaiador escollit fou un grup aminopropil, ja que concedia una certa distància entre el suport sòlid (gel de sílice) i el SQ (Figura 2.28).

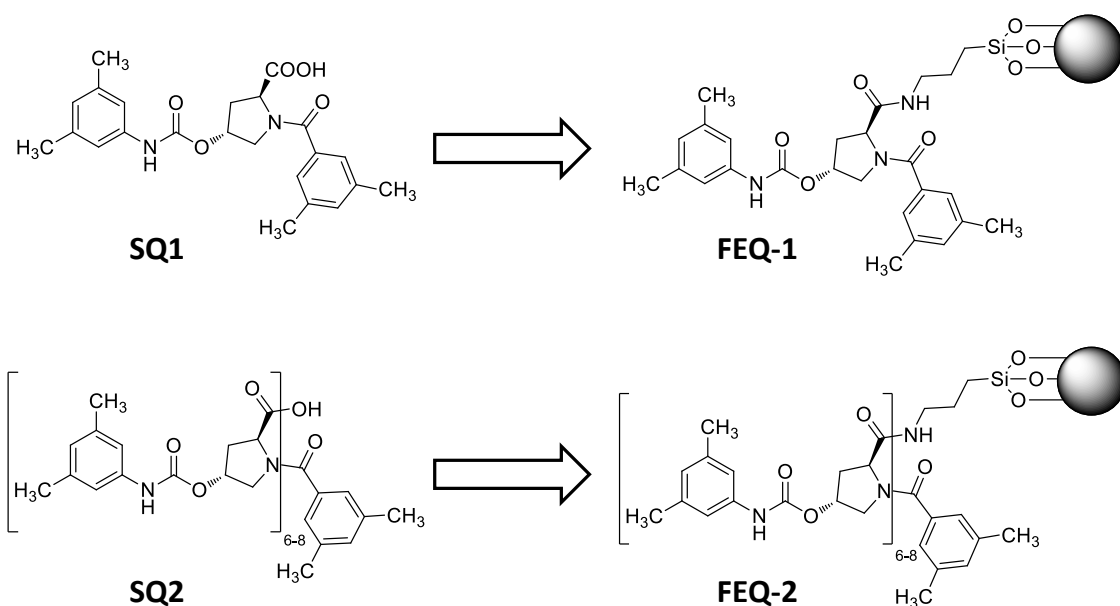


Figura 2.28. Els SQs dissenyats pel grup de Minguillón i les corresponents FEQs [87].

La síntesi del **SQ2** es va realitzar seguint un protocol de fase sòlida tipus Boc (Figura 2.30) que resulta força tediós. En primer lloc, s'havia de realitzar una síntesi de 5 passos per tal d'obtenir l'àcid *N*-(9-hidroximetil-2-fluorenil)succinàmic (HMFS)[88] (Figura 2.29). Aquest s'empraria com a *linker* unint-lo a una resina de poliestirè aminometilada.

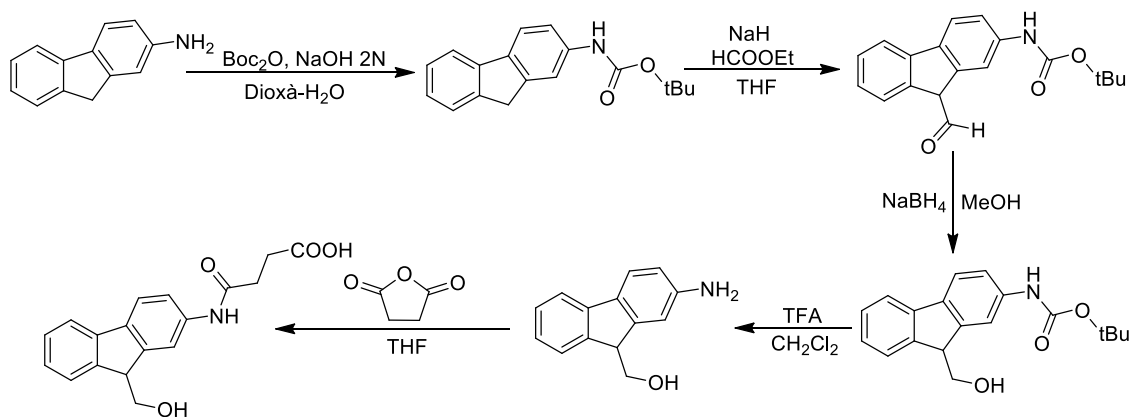


Figura 2.29. Esquema sintètica de l'espaiador [88].

Com a pas previ a la síntesi del pèptid, s'havia de derivatitzar l'hidroxiàminoàcid ja protegit mitjançant una reacció amb 3,5-dimetilfenilisocianat per tal d'obtenir l'entitat fonamental. A partir d'aquí, es procedia a l'elongació del pèptid mitjançant 8 cicles de *coupling* amb *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC), 1-hidroxibenzotriazole (HOBt) i DMF, alternats amb les corresponents 8 desproteccions utilitzant una dissolució al 40% d'àcid trifluoroacètic (TFA) en clorur de metilè (DCM). Un acoblament addicional usant àcid 3,5-dimetilbenzoic (DIC, HOBt, DMF) es va dur a terme per tal d'introduir el grup

N-terminal. Finalment, el pèptid es va escindir de la resina mitjançant un tractament amb morfolina en DMF.

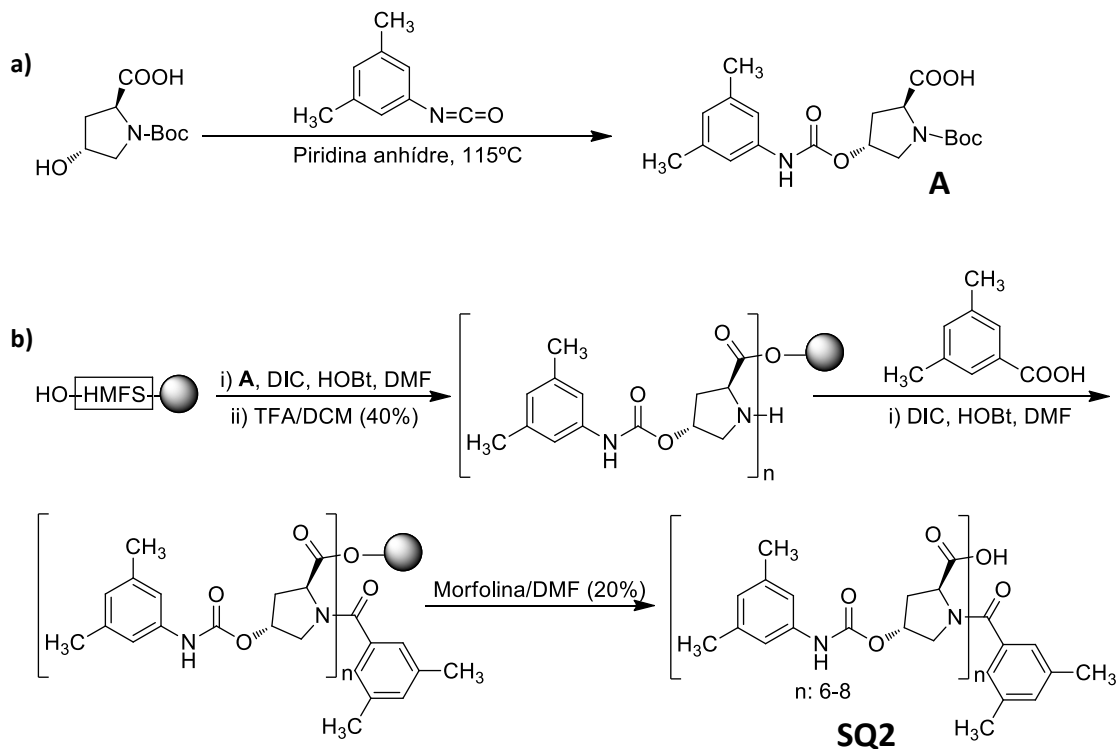


Figura 2.30. Protocol de síntesi del pèptid utilitzat com a **SQ2**.

La fixació dels SQs per tal d'obtenir les FEQs (**FEQ-1** i **FEQ-2**) es va dur a terme segons els procediments convencionals [89,90].

L'avaluació de les FEQs va demostrar que l'enantioselecció de la **FEQ-1** quedava estrictament limitada a compostos amb grups 3,5-dinitrobenzoil (DNB), tan emprant mesclades d'heptà/ CHCl_3 com heptà/2-PrOH com a fase mòbil. En canvi, la **FEQ-2** manifestava uns valors d'enantioselecció significativament més elevats i el ventall d'anàlits separats no es limitava als compostos amb grups DNB. A més a més, quan es va realitzar un estudi de comparació de la capacitat de càrrega, la **FEQ-2** era capaç de separar 5 vegades més de mescla racèmica que la **FEQ-1**. Tan la millora en l'enantioselecció com en la capacitat de càrrega es van atribuir bàsicament a l'essència polimèrica de la **FEQ-2**.

A més a més, la **FEQ-2** es va provar utilitzant diverses mesclades de dissolvents com a fases mòbils. En fase inversa (MeOH/Aigua i ACN/Aigua), es van poder resoldre alguns compostos, la qual cosa era molt sorprenent per una FEQ amb un SQ de pes molecular relativament petit. No obstant, l'enantioselecció es va reduir dràsticament i només aquells anàlits que contenen anells acceptors d'electrons pogueren ser resolts gràcies al rol de les interaccions tipus π - π complementàries. També es va provar la columna

sense dissolvents alcohòlics o aquosos en la fase mòbil, utilitzant CHCl_3 , un dissolvent d'ús habitual en les FEQs de tipus Pirkle. En aquest cas, la **FEQ-2** va ser incapaç de resoldre cap analit racèmic i va mostrar un patró de retenció molt diferent a l'obtingut utilitzant la **FEQ-1**, ja que s'obtenien temps de retenció molt elevats. No obstant, en afegir petites quantitats de 2-PrOH en la fase mòbil ($\text{CHCl}_3/2\text{-PrOH}$, 98:2), s'obtenia una retenció molt menor i en alguns analits s'assolia una separació parcial (Figura 2.31).

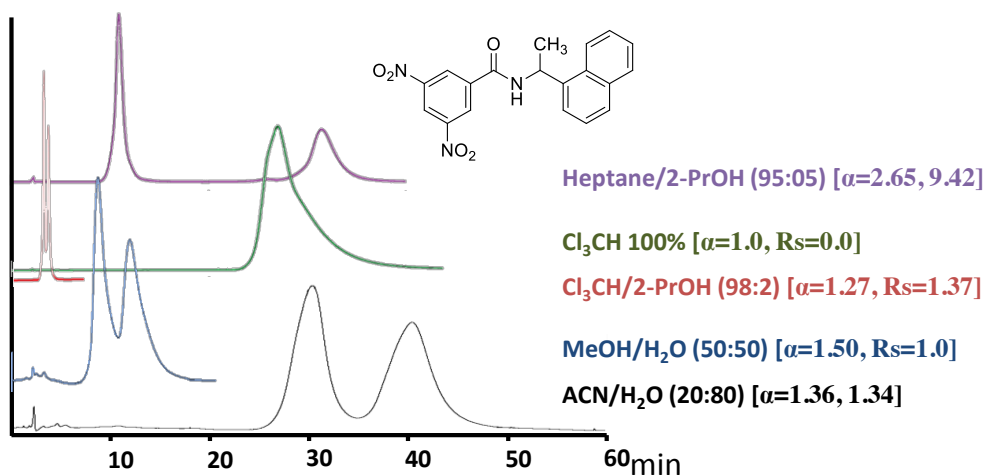


Figura 2.31. Enantioseparacions cromatogràfiques de l'analit de la figura utilitzant la **FEQ-2** emprant com a fases mòbils diferents mesclades de dissolvents.

Tots aquests canvis en el comportament cromatogràfic, en la retenció i també en la selectivitat com a funció de la fase mòbil suggerien un rol significatiu del 2-PrOH en l'enantioselectivitat. A més, es va considerar la possibilitat d'un canvi en la conformació del **SQ2**.

Per tal d'examinar més extensament la importància de la fracció central del SQ, Sancho i Minguillón van preparar unes FEQs anàlogues enllaçades a través de la funció amino N-terminal (Figura 2.32) que hauria de facilitar l'accessibilitat dels analits a l'esquelet d'oligoprolina [91]. Aquesta unitat podria tenir probablement un rol director en l'orientació del SQ pel reconeixement amb l'analit, afectant així l'enantioselectivitat.

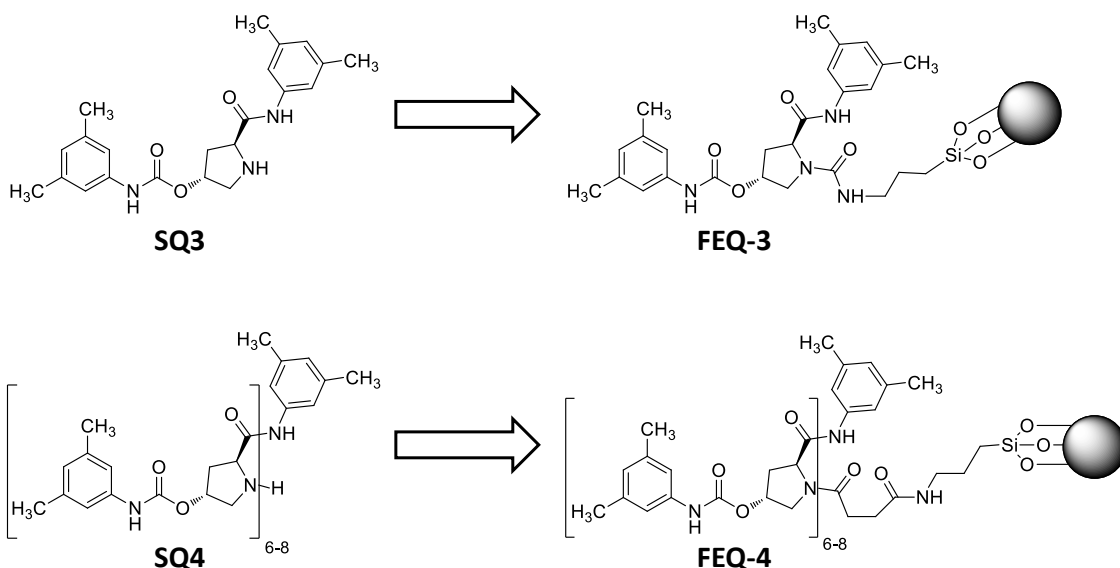


Figura 2.32. SQs amb el grup amino N-terminal lliure dissenyats pel grup de Minguillón i les corresponents FEQs [91].

La síntesi del pèptid (**SQ4**) (Figura 2.33) es va realitzar igual que l'anterior, duent-se a terme el mateix protocol de síntesi peptídica en fase sòlida tipus Boc. No obstant, el pèptid es va escindir de la resina amb l'extrem amino N-terminal protegit amb el grup Boc, obtenint l'àcid carboxílic corresponent. En aquest punt es va procedir a la incorporació de la 3,5-dimetilanilina mitjançant la reacció del derivat peptídic en presència de *N*-etoxycarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolona (EEDQ) com agent d'acoblament. Un cop desprotegida l'amina, es va inserir un espaïador formant l'amida corresponent mitjançant la reacció de l'amina secundària de la prolina amb anhidrid succínic.

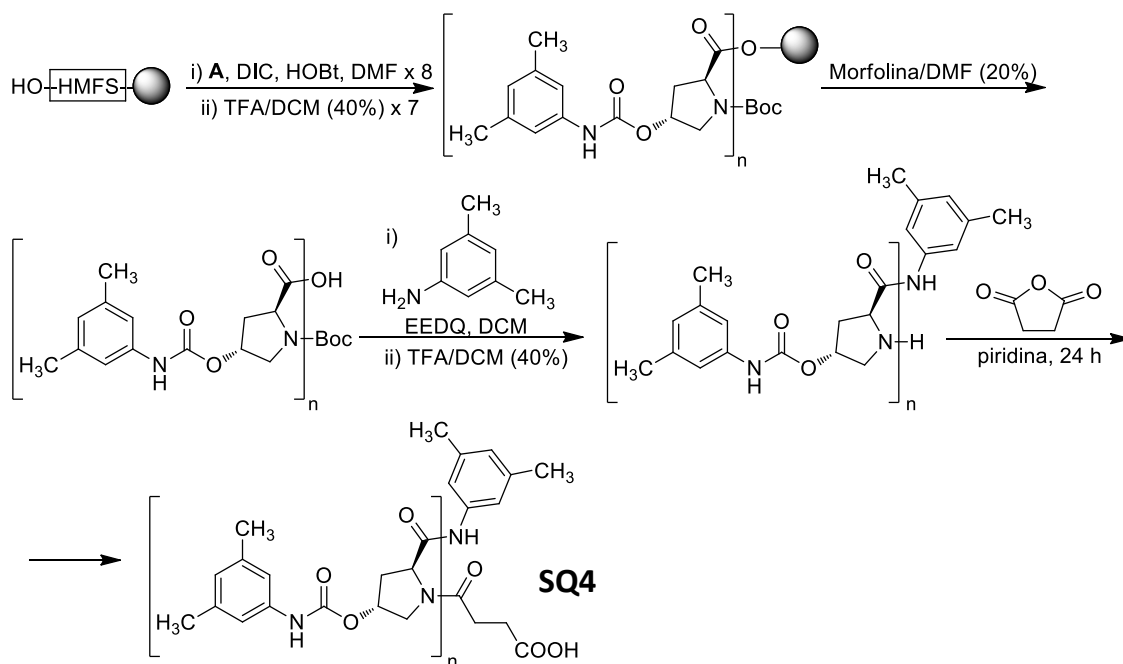


Figura 2.33: Protocol de síntesi del pèptid utilitzat com a **SQ4**.

En un primer estadi, quan es van provar **FEQ-3** i **FEQ-4**, la primera només va ser capaç de proporcionar millors valors d'enantioselectivitat per alguns racèmics derivats de dinitrobenzoil aminoàcids, de manera anàloga a l'estudi comentat anteriorment [87]. En canvi, utilitzant **FEQ-4** es van poder resoldre una destacable varietat de compostos racèmics, sobretot aquells que contenen un segon sistema aromàtic, el qual probablement estaria implicat en el mecanisme d'associació amb el SQ. Aquesta observació apunta cap a un diferent mecanisme d'enantioreconeixement entre aquests dos tipus de fases, monoproline vs. oligoproline.

Quan es van comparar els resultats de **FEQ-2** amb **FEQ-4**, el temps de retenció de molts analits provats era significativament menor i l'enantioselectivitat major utilitzant la darrera columna. A més a més, el domini d'aplicació es va veure també incrementat. No obstant, la densitat d'unitats de proline per gram de FEQ era lleugerament més gran per **FEQ-4** (0,17 mmol/g) que per **FEQ-2** (0,12 mmol/g). Una segona i també molt rellevant diferència era la distribució de la mescla peptídica: **FEQ-2** contenia una quantitat superior d'heptaproline i inferior d'octaproline (7 unitats: 50% i 8 unitats: 32%), que **FEQ-4** (7 unitats: 32% i 8 unitats: 60%).

FEQ-4 també es va provar utilitzant diverses fases mòbils de diferent naturalesa. Quan s'utilitzava CHCl₃ en la fase mòbil, l'enantioselectivitat desapareixia, de manera anàloga el que succeïa amb **FEQ-2**. Aquest fenomen no era del tot immediat, ja que es podia observar com α disminuïa al llarg del temps. A més, aquest fet era clarament reversible, ja que quan es tornaven a utilitzar mescles d'heptà/2-PrOH, els valors normals d'enantioselectivitat es tornaven a recuperar. Per tal de profunditzar en aquesta observació, Sancho i Minguillón van realitzar diferents estudis espectroscòpics (dicroisme circular i ¹H i ¹³C RMN).

Desafortunadament, la forta absorció del CHCl₃ en dicroisme circular va impedir l'ús d'aquest dissolvent en aquesta tècnica. No obstant, es van poder registrar espectres en MTBE, ACN i Heptà/2-PrOH (90:10 v/v). Les bandes dels espectres, tot i que eren de diferent intensitat, indicaven una conformació tipus PPII dels SQs (**2** i **4**) en tots els dissolvents.

Les observacions en ressonància magnètica foren més reveladores. En els espectres de ¹³C RMN utilitzant CDCl₃ i piridina-d₅ apareixien senyals múltiples per les posicions anàlogues de cada unitat de proline. Aquest desdoblament suggereix una distribució aleatòria de la disposició *cis* i *trans* dels enllaços amida dins les molècules, traduint-se en una major flexibilitat i desordre del pèptid quan està immers en aquests dissolvents. Aquesta observació clarament convergeix amb els estudis realitzats per Zhang i Madalengoitia[92], on oligòmers d'entre 2 i 4 unitats de proline protegides per

N-Boc i O-benzil (Boc-(Pro)_n-OBn) en CDCl₃ contenen una distribució pràcticament aleatòria d'enllaços *cis* i *trans*.

De fet, paral·lelament, la conformació de l'oligòmer de decaprolina fou investigada per Li i col·laboradors en un sistema de dissolvents constituït per 2-PrOH/DCM, usant diferents tècniques espectroscòpiques com la rotació òptica, dicroisme circular electrònic (ECD), infraroig (IR) i dicroisme circular vibracional (VCD) [93]. En aquest estudi, se suggereix que la conformació de l'oligoprolina és la mateixa en totes les composicions (de 0% de 2-PrOH a 100% 2-PrOH), presumptament PPII. No obstant, en tots els espectres realitzats, el comportament més anòmal correspon a la poliprolina immersa en 100% de DCM. Tant és així que l'estudi del comportament cromatogràfic de l'analit avaluat en 100% de DCM no es va poder realitzar. També cal destacar que, segons aquest estudi, els grups carbonil (C=O), principalment responsables de l'enantiodiscriminació en la decaprolina, no esdevenen saturats fins que el contingut de 2-PrOH supera al 60% de la mescla.

Li i col·laboradors van interpretar aquestes observacions cromatogràficament analitzant el 2,2,2-Trifluoro-1-[10-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxi-etil)-9-antril]-etanol (DiTFAE) a diferents composicions de 2-PrOH/DCM (Figura 2.34). A composicions inferiors al 20% de 2-PrOH, l'enantioseparació no es produeix tot i la llarga retenció. Per això es creu que l'analit té interaccions directes amb el SQ. A partir d'aquesta composició, quan el percentatge de 2-PrOH incrementa en la fase mòbil, tant la retenció com l'enantioselectivitat disminueixen. En aquest interval s'estaria produint una competició entre l'analit i el dissolvent per a la interacció amb la FEQ. Un cop arribat al 60% de 2-PrOH es produeix un punt d'inflexió, i el comportament anterior canvia ja que tant els factors de capacitat com el de separació augmenten. Aquest punt simbolitza el punt de saturació, i a partir d'aquí les molècules de l'analit interaccionen amb l'estructura de decaprolina condicionada per la seva completa saturació pel 2-PrOH.

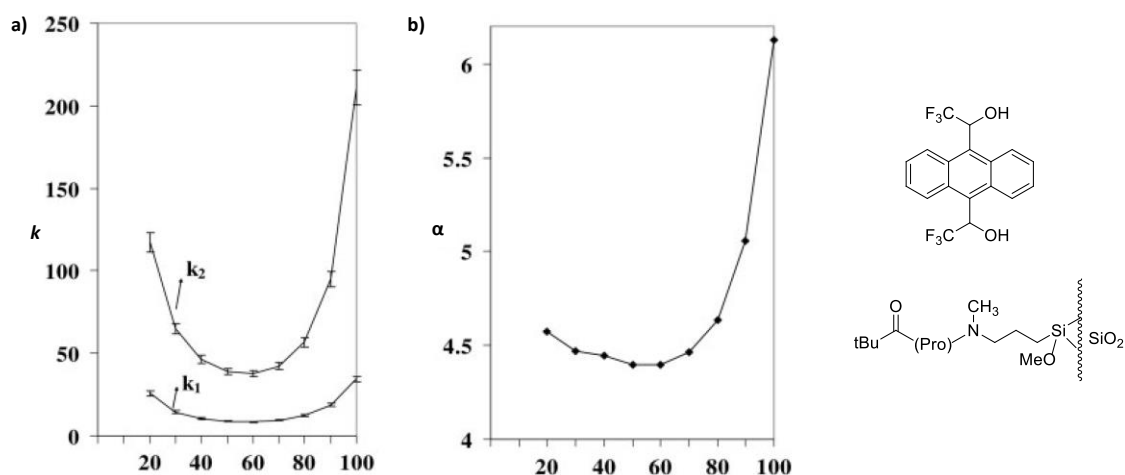


Figura 2.34. Factors de retenció (a) i factors de separació (b) assolits pel 2,2,2-trifluoro-1-[10-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxi-1-etil)-9-antril]-etanol en el sistema de dissolvents 2-PrOH/DCM emprant una FEQ derivada de la decaprolina [91].

Un cop ja iniciada la fase experimental de la meua recerca doctoral, Lao i Gan van publicar diferents estudis de FEQs basades en derivats d'oligoprolina [94]. Aquests autors es van enfocar principalment en pèptids molts curts, sobretot en FEQs basades en diprolines i triprolines i en els seus derivats. Lao i Gan van preparar iònicament i covalentment (mitjançant una doble unió amb una amida terciària com a *linker*) FEQs amb SQs tipus diprolina (Figura 2.35), demostrant que la seva estructura rígida deguda a aquesta doble unió no és beneficiosa en termes d'estabilitat de la FEQ, però sí que de vegades afavoria els processos d'enantioreconeixement [95].

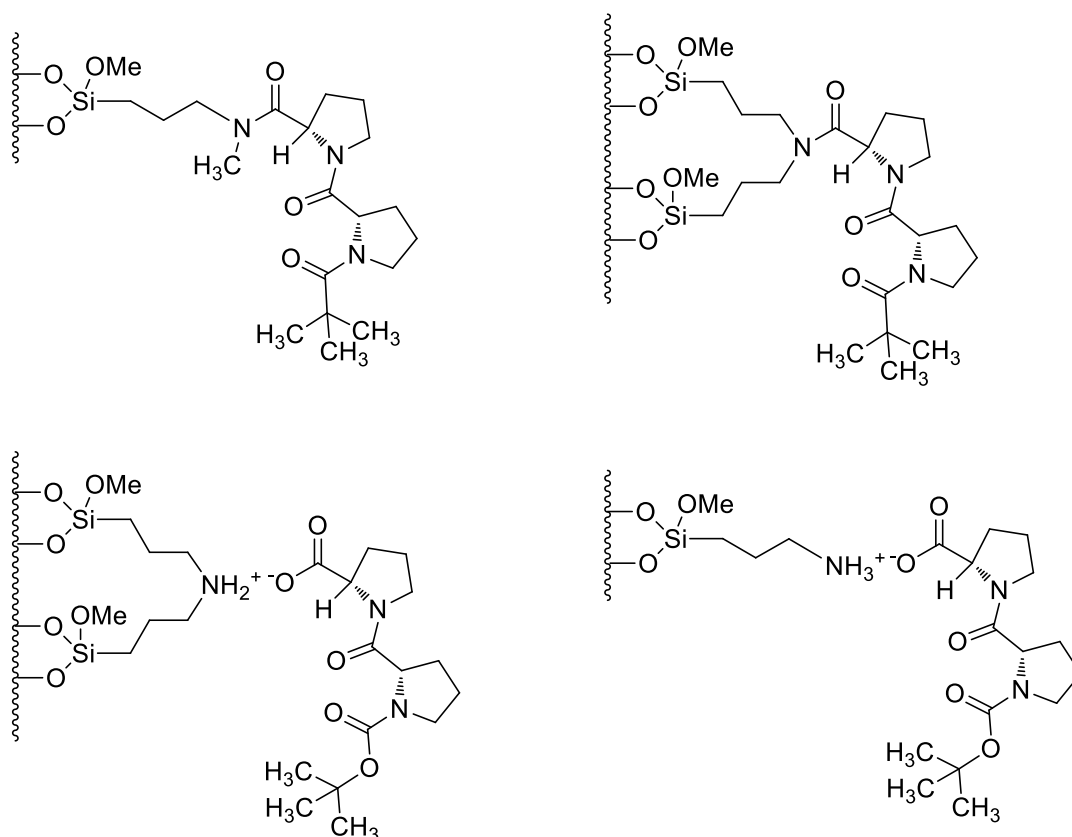


Figura 2.35. Estructura de les FEQs de diprolina unides covalentment (part superior) i iònicament (part inferior) [95].

També van estudiar els gràfics de van't Hoff per aquestes mateixes FEQs, pre- i post-*end-capping* per certs analits. La contribució de les forces no-enantioselectives (o no-específiques) dels silanols residuals es va reduir dràsticament després de l'*end-capping* [96]. Lao i Gann també van preparar i estudiar cromatogràficament FEQs tipus triprolina i trimetilprolina (Figura 2.36) amb una sèrie d'analits classificats com a portadors de cap, un, dos o tres grups donadors d'hidrogen [97]. Mitjançant diversos experiments, els autors van demostrar que les interaccions per pont d'hidrogen dels analits són un factor primari en la retenció i en l'enantioselectivitat tant en fase normal com en mode polar orgànic. Comparant l'eficiència de les dues FEQs, aquests dos autors també reconeixen la importància de l'àtom d'hidrogen en l'estereocentre de la prolina (Figura 2.36). A més a més, el mode en fase normal fou identificat com el millor mode per treballar amb FEQs tipus oligoprolina. L'ús de modificadors orgànics com el metil *tert*-butil èter i l'acetat d'etil van incrementar la separació de certs enantiòmers.

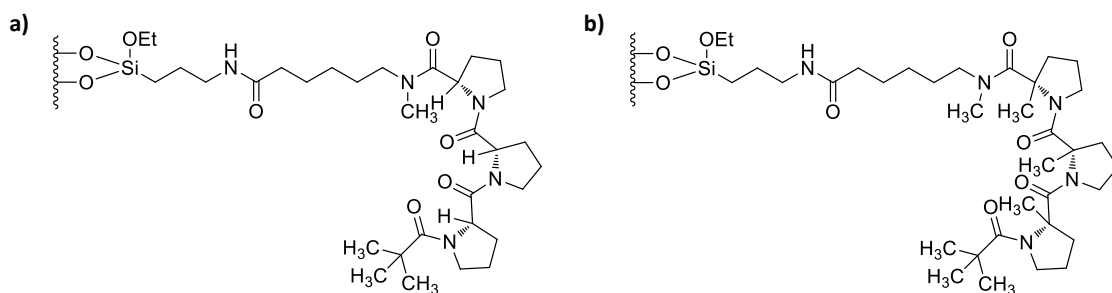


Figura 2.36. a) FEQ derivada de la tri(L-prolina), b) FEQ derivada de tri(α -metil-L-prolina) [97].

Per últim, els càlculs teòrics realitzats per Ashtari i Cann [98,99] resulten també molt interessants. Els autors tenen en compte la possibilitat que cada enllaç amida pugui adoptar una conformació *cis* o *trans*. Per tant, per una cadena de n prolines, es poden obtenir n^2 conformacions diferents (Figura 2.37). També foren considerades altres variables com el propi plegament de cada unitat de prolina i l'orientació dels grups carbonil. Es va demostrar que teòricament les conformacions resultants regides per tots aquests factors haurien de tenir un impacte notable en les interaccions que el SQ pot establir, en la solvatació del SQ i en l'estabilització per ponts d'hidrogen d'aquest.

En un primer treball, Ashtari i Cann estudiaren dues FEQs de diprolina que diferien només en el grup terminal, Tma i Boc (Figura 2.29.a). Els dos selectors de diprolina mostraven distintes preferències conformacionals: el SQ acabat en Tma tenia una preferència per a la conformació TT (*trans trans*), mentre que la mínima energia del selector quiral amb un grup Boc corresponia a la conformació CT (*cis trans*). La forma torçada del SQ acabat en Boc (Figura 2.37) i la inaccessibilitat de l'oxigen del carbonil d'entre els dos residus de prolil fan que aquest SQ no sigui propici al reconeixement enantioselectiu. Conseqüentment, donada la diferent conformació i accessibilitat dels dos selectors, no és sorprenent que l'enantioselectivitat depengui fortament de la naturalesa del grup terminal, tal com s'havia demostrat experimentalment [76,100].

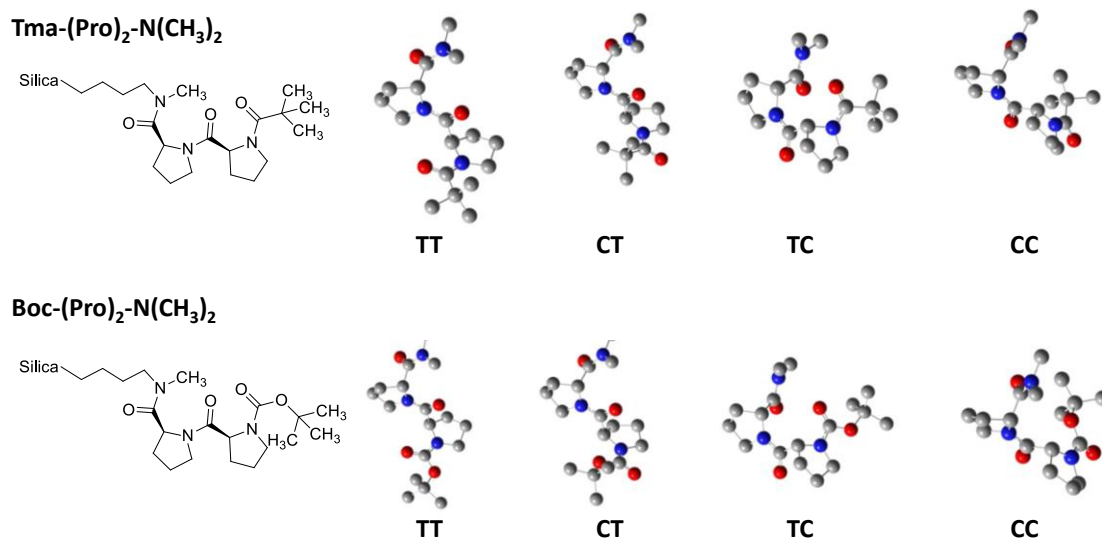


Figura 2.37. FEQs tipus diprolina estudiades per Ashtari i Cann [98] i les quatre conformacions que poden adoptar els mencionats SQs de diprolina.

A més a més, els estudis d'aquests autors apunten a una gran rellevància dels dissolvents en els que les FEQs es troben immerses. Els autors senyalaven que els solvents alteraven les distribucions conformacionals dels SQs, introduint enllaços d'hidrogen entre el dissolvent i el SQ. Virtualment, gairebé tots els ponts d'hidrogen tenen lloc en els àtoms d'oxigen dels grups carbonil, i només uns quants s'estableixen amb els àtoms de nitrogen. A més a més, com més caràcter pròtic té el dissolvent en qüestió, més ponts d'hidrogen es formen amb el SQ. Així doncs, un terç dels selectors quirals tenen un enllaç d'hidrogen en n-hexà/2-PrOH, una proporció que augmenta fins als 4/5 quan el càlcul es realitza considerant MeOH/aigua com a solvent.

Per tal de seguir la discussió en cadenes més llargues de prolina, Ashtari i Cann van realitzar un segon estudi de dinàmica molecular examinant les propietats estructurals i el comportament teòric de 4 FEQs quirals de diferent llargària (3, 4, 5 i 6 unitats de prolina) (Figura 2.38) en dos sistemes de dissolvents comuns en cromatografia, Aigua:MeOH i hexà:2-PrOH [99], en els quals s'espera que s'hi promoguin diferents poblacions conformacionals de poliprolina. Com que el SQ terminat en pivaloïl oferiria una major enantioselectivitat en dímers [98], va ser aquest selector l'escollit per a realitzar el càlcul.

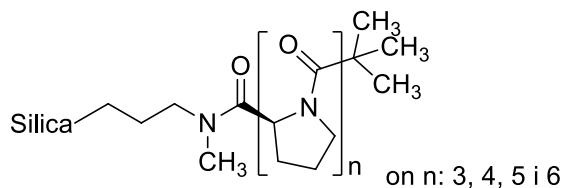


Figura 2.38. FEQs estudiades per Ashtari i Cann [99].

Segons una sèrie de simulacions de dinàmica molecular per cada polímer, es va determinar com a essencial el rol del dissolvent, tant en presència de n-hexà/2-PrOH (simulant la fase normal) com d'aigua/metanol (simulant la fase inversa), degut a que s'obtenien un nombre menor de confòrmers de més baixa energia respecte al mateix estudi simulat en fase gas. Aquest nombre era encara menor en el sistema aigua/MeOH que en n-hexà/2-PrOH, ja que aquest últim ofereix un major desordre i flexibilitat al tenir un caràcter més apolar. La presència d'aigua i metanol produeix forts enllaços d'hidrogen amb qualsevol dels grups carbonil de la cadena poliprolina, sobretot amb aquells que es troben a la part central de l'esquelet. Aquestes interaccions confereixen una estructura més rígida i ordenada, i per tant, els SQs són més compactes com més polar és l'ambient. En canvi, aquests SQs en fase normal tenen menys probabilitat de formar enllaços d'hidrogen amb el dissolvent. Es calcula que per l'hexaprolina només un 20% dels llocs de reconeixement estarien ocupats, deixant una gran majoria de grups carbonil acceptors viables per tal de dur a terme interaccions necessàries en els mecanismes d'enantioselecció.

Si es té en compte la llargada del pèptid, el nombre de confòrmers observats en la interfase incrementa del trímer al tetràmer. A partir d'aquí es produeix un punt d'inflexió ja que la població conformacional disminueix dràsticament del tetràmer al pentàmer, i del pentàmer a l'hexàmer. De fet, per l'hexaprolina un sol esquelet conformacional representa més del 83% de la població dels selectors en n-hexà/2-PrOH i més del 90% en aigua/MeOH. Així doncs, encara que els confòrmers tendeixin a manifestar una mescla d'amides *cis* i *trans* en pèptids petits i en fase gas, més enllà del tetràmer i en dissolvents polars, la rigidesa conformacional incrementa, fet que explica la millora de l'enantioselectivitat en poliprolines més llargues.

L'estudi acaba confirma l'important rol del grup terminal. Si es comparen Tma i Boc, l'estudi no només confirma que el SQ que conté un grup Boc terminal té un nombre de confòrmers major per tots els SQs, si no que la flexibilitat dels SQs és més elevada en dissolució que en fase gas, fet oposat al calculat pels anàlegs amb Tma.

Finalment, per tal de complimentar la informació detallada en aquesta part introductòria, s'adjunta seguidament un capítol de llibre [34], escrit durant la present tesi doctoral, que descriu els diferents mètodes cromatogràfics enantioselectius emprats en l'obtenció i determinació d'enantiòmers.

Capítol de Llibre [35]

Arnau NOVELL, Cristina MINGUILLÓN. “Chiral Chromatographic Methods in the Analysis of Enantiomers” en *Stereoselective Synthesis of Drugs and Natural Products*. 1a Edició (Ed. V. Andrushko, N. Andrushko), John Wiley and Sons, (2013) 1601-1618.

CHIRAL CHROMATOGRAPHIC METHODS IN THE ANALYSIS AND PURIFICATION OF ENANTIOMERS

ARNAU NOVELL AND CRISTINA MINGUILLÓN

INTRODUCTION

The chiral nature of biomolecules, such as proteins, carbohydrates and nucleic acids, has manifested implications in the use of enantiomers of bioactive compounds. Among others, chirality has a major impact on the pharmaceutical industry. At present, chirality cannot be overlooked in the design, discovery, development, and manufacture of new drugs^{1–3} (Figure 54.1).

Health authorities worldwide have fixed purity requirements for active pharmaceutical ingredients (APIs).⁵ When applied to chiral drugs, this implies that, if one enantiomer is chosen to be developed and marketed as an API, the counterpart isomer will be considered an impurity. The rule affects new chemical entities (NCEs) and chiral drugs previously commercialized as a racemic mixture (*chiral switches*). Therefore, techniques to perform the analytical control of the enantiomeric composition, at any of the drug development steps, together with processes to produce enantiomeric compounds with the desired enantiomeric purity, are essential in this domain. Liquid chromatography using chiral stationary phases (CSPs) is applied at two levels, analysis and production of enantiomerically pure compounds.^{6,7} At present, it can be considered the most universal technique for enantiomer separation.

Natural compounds usually exist in one enantiomeric form. However, racemization may occur during ripening of fruits,⁸ storage,⁹ or treatment of products manufactured from natural sources.¹⁰ In this context, enantioselective analysis is either applied to the determination of configuration in newly discovered compounds¹¹ or to assess the authenticity and quality of natural medicines and

foodstuff.¹² The technique of choice for these purposes depends, among others, on the physical properties of the analytes considered, the availability of the sample, or its nature. Thus, for volatile compounds, flavors, terpenes, and terpenoids, gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) is preferred for analytical applications¹³ while supercritical fluid chromatography (SFC)¹⁴ or high-performance liquid chromatography (HPLC)¹⁵ are better adapted to preparative purposes. Moreover, the latter is also applicable to more polar compounds than the former. Alternatively, capillary electrophoresis and its multiple modalities are only used with analytical purposes.¹⁶ In general terms, electromigration techniques, often coupled to mass spectrometry (MS), are better suited to polar analytes and aqueous complex samples. The high efficiency and low volume of sample demand are major advantages, despite the relatively poor limit of detection of these techniques.

54.1. CHIRAL ANALYSIS: THE DIVERSE APPROACHES

Enantiomers are stereoisomers with identical physico-chemical properties and, therefore, are indistinguishable under conventional conditions. Only when exposed to a chiral anisotropic environment, such as circularly polarized light or the presence of a chiral structure, do differences become apparent. This principle is on the basis of the pharmacological differences between enantiomers and on that of the enantioselective chemical procedures.

When the analysis of enantiomers has to be undertaken, two approaches are possible. First, to facilitate

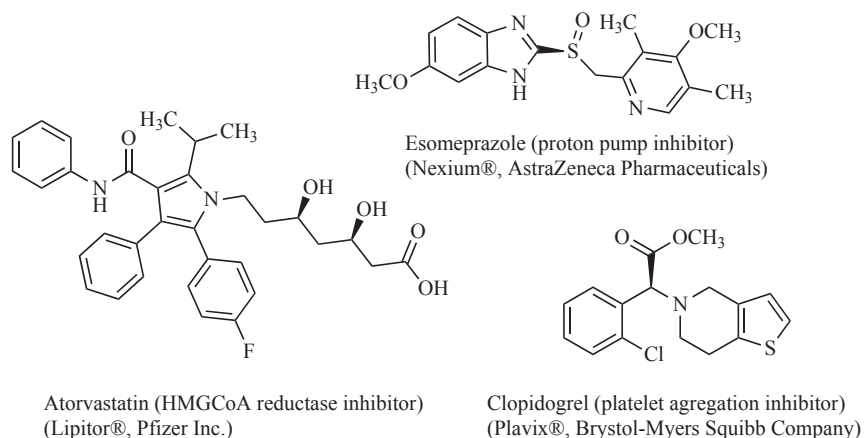


FIGURE 54.1. Seven out of the ten top drugs in sales in 2010 in the United States⁴ are sold as enantiomerically pure forms, while only two are achiral compounds (in the figure, the three top drugs on the 2010 list).

differentiation, enantiomers can be converted into diastereomeric compounds by the reaction with a chiral enantiomerically pure reagent. The resulting isomers, which usually differ in physicochemical properties, can be analyzed by conventional means. The processes in which this approach is used are designed as *indirect methods*. Thus, chiral derivatizing agents (CDAs) are used in the indirect determination of enantiomeric composition by nuclear magnetic resonance (NMR)¹⁷ and by gas chromatography (GC)¹⁸ and HPLC.¹⁹ These latter methods avoid the use of expensive CSPs as conventional stationary phases can be employed.

Nevertheless, in general terms, the limitations surpass the advantages for the indirect approach.^{20,21} Compounds to be analyzed should present a chemical group liable to be derivatized in straightforward and smooth conditions. The integrity of the configuration of the sample components has to be ensured during derivatization. Additionally, the completeness of the reaction has to be guaranteed for the two isomers as any possible kinetic resolution effect will result in an inaccurate determination of the enantiomeric excess. Often the chiral derivatizing agent is used in excess to avoid this problem, even if it may interfere in the analysis.

Also, the enantiomeric purity of the derivatizing agent becomes crucial in the correct determination of enantiomeric composition. The presence of minor amounts of the undesired enantiomer results in inaccurate determinations. Unfortunately, the enantiomeric purity of the chiral reagent is often either lower than 99% or even unknown, thereby preventing the determination of the unwanted enantiomer at the level needed to accomplish the exigencies of the regulatory medicine agencies.

In summary, even if indirect methods may be advantageous in certain occasions, as they permit the incorporation of groups to facilitate detection and increase sensitivity

(chromophore, fluorophore groups, etc.), this approach is reputed to be time-consuming and easily affected by inaccuracies. Therefore, indirect methods are considered hardly compatible with the high-throughput requirements of pharmaceutical companies, and hence, they are not the first choice when undertaking the analysis of enantiomers.

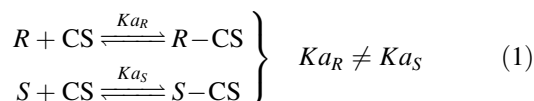
The second approach, the so-called *direct method*, consists of the direct determination of enantiomers immersed in a chiral environment. A diversity of techniques has been used to determine enantiomeric composition in samples. Polarimetry, NMR using chiral solvating agents (CSAs), or the different chromatographic and related techniques are the most popular. Polarimetry is still broadly applied in organic chemistry laboratories at least as a semiquantitative method. The general, easy-to-perform, and nondestructive characteristics of polarimetry are properties that justify its use. However, limitations such as the need to know the specific optical rotation for the compound of interest, the inherent low sensitivity, and the possible inaccuracies related to the presence of impurities or to the low specific rotation of certain compounds cannot be overlooked.

NMR is not affected by some of the preceding limitations.²² Differences in chemical shift for signals assignable to each enantiomer are the result of a differentiated perturbation of the magnetic environment of the affected signals, together with the extension of association between CSA and enantiomers. Nevertheless, in general terms, these differences are small when chiral solvating agents are used to induce enantiodiscrimination. The result is a low probability to obtain completely resolved signals for enantiomers. Moreover, as polarimetry, NMR has a low sensitivity, which imposes the use of a considerable amount of sample and makes difficult the determination of a very low content of one enantiomer in a sample where the other is the major component. These reasons make techniques involving

separation, such as chromatographic and electrophoretic methods, preferred.⁶ The identical response of the two enantiomers to most detectors, together with the high sensitivity of most separation techniques, also constitute advantages for the direct analytical approach involving enantioseparation. Nevertheless, even if at present they are routinely used in laboratories, all suffer from the same great inconvenience. Often, the lack of predictability and general applicability makes the search for the appropriate chiral selector, separation conditions, and CSPs a trial-and-error game only tempered by experience.

54.2. ASSOCIATION CHIRAL SELECTOR-ENANTIOMERS

As mentioned, a chiral environment is required to induce differences between enantiomers. In chromatography, a chiral molecule, the so-called *chiral selector* (CS), is responsible for producing this environment. The mechanism of enantioseparation involves the formation of transient diastereomeric adsorbates between CS and enantiomers, which are based on weak noncovalent interactions. Differences in stability for the two adsorbates CS/enantiomer determine separation:



Equilibrium binding constants, K_{a_i} , for the two adsorbates are related to the standard Gibbs free energy change, ΔG_i° :

$$\begin{aligned} \Delta G_R^\circ &= \Delta H_R^\circ - T\Delta S_R = -RT \ln K_{aR}; \\ \Delta G_S^\circ &= \Delta H_S^\circ - T\Delta S_S = -RT \ln K_{aS} \end{aligned} \quad (2)$$

If by convention we consider $K_{aR} > K_{aS}$, the difference for the two enantiomers can be expressed as:

$$\Delta\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{K_{aR}}{K_{aS}} \quad (3)$$

Therefore, if the CS is fixed onto the stationary phase and considering only interactions between CS and analytes, chromatographic parameters such as *capacity factors* (k'_i) can be expressed as a function of association constants CS/enantiomer:^a

^a This assumption assumes that the distribution coefficient stationary/mobile phase at the equilibrium (K_{Di}) can be assimilated to the association constant. Although unspecific interactions contributing also to the retention of the analyte, such as those owing to the lack of homogeneity of the support surface, are not considered, it has to be kept in mind that these affect the two enantiomers in the same manner.

$$k'_i = \frac{C_{SP}}{C_{MP}} \frac{V_{SP}}{V_{MP}} = K_{Di} \frac{V_{SP}}{V_{MP}} = Ka_i \frac{V_{SP}}{V_{MP}} \quad (4)$$

Also, considering $K_{aR} > K_{aS}$, the *selectivity factor* (α)—ratio of capacity factors for two consecutive peaks—can be expressed as follows:

$$\alpha = \frac{k'_R}{k'_S} = \frac{Ka_R}{Ka_S} \quad (5)$$

Therefore, the selectivity factor α is a measure of enantioselectivity for a given CS and a specific pair of enantiomers. It can be determined directly on the chromatogram as:

$$k'_i = \frac{t_i - t_0}{t_0} \quad (6)$$

and considering equation (5):

$$\alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} \quad (7)$$

where t_0 is the eluting time for the void volume marker and 1 and 2 are the first eluted (lower Ka) and the more retained enantiomer (higher Ka), respectively. Moreover, considering equation (3):

$$\Delta\Delta G^\circ = -RT \ln \alpha \quad (8)$$

which accounts for the success of chromatographic enantioseparation techniques. For a pair of enantiomers, differences in adsorbate stability as low as 121 J/mol result in a visible HPLC separation of $\alpha = 1.05$.²³

54.3. CHIRAL SELECTORS AND RECOGNITION MECHANISMS

As indicated, the most extended procedure to chromatographically separate enantiomers involves the use of chiral stationary phases. CSPs consist of a chromatographic matrix that incorporates a CS physically or chemically immobilized. The chemical bonding of the CS on the chromatographic matrix, when it is permanent, makes the CSP a robust tool. As a result, the use of a diversity of chromatographic conditions is allowed, and consequently, the probability to attain the desired separation increases. A broad range of chiral molecules and chiral materials has been used as potentially useful CSs. Accordingly, an impressive number of CSPs for gas (GC) and liquid chromatography (HPLC) is commercially

available. We focus the following description mainly on these latter CSPs.

Nowadays the number of commercialized CSPs for liquid chromatography is in the order of hundreds. Apart from the obvious commercial interests, the diversity of existing CSPs responds to the required structural complementarity between CS and analyte to obtain enantioselective recognition.²⁴ However, often the broad diversity makes the choice of the most adequate CSP to attain particular needs difficult. Moreover, taking into account their high price, a broad application domain is a strongly recommendable feature for a CSP. Nevertheless, applicability is not amenable to modulation. Instead, the broadness in the scope of application is dependent on the kind of CS incorporated into the chromatographic material, and not the only property to consider when undertaking the enantioseparation of a previously unknown chiral compound.

54.3.1. Proteins as Chiral Selectors

The CSPs showing the broadest application domain are those containing a covalently bonded protein as CS.²⁵ α 1-Acid glycoprotein (AGP), human (HSA) and bovine serum albumin (BSA), and ovomucoid (OVM) are some of the proteins used for this application. Also, the enzyme cellobiohydrolase I (CBH I) is used for this purpose. The applicability of the resulting CSPs is governed by the isoelectric point of the protein acting as CS. Thus, CBH is more adequate for basic compounds, while HSA is more appropriate for acidic analytes, with AGP-containing CSPs being the most versatile.²⁶

The characteristic broad applicability of these CSPs is the result of the structure of the CS. All proteins, but plasmatic proteins in particular, contain many potential and diverse recognition sites (Figure 54.2). In addition

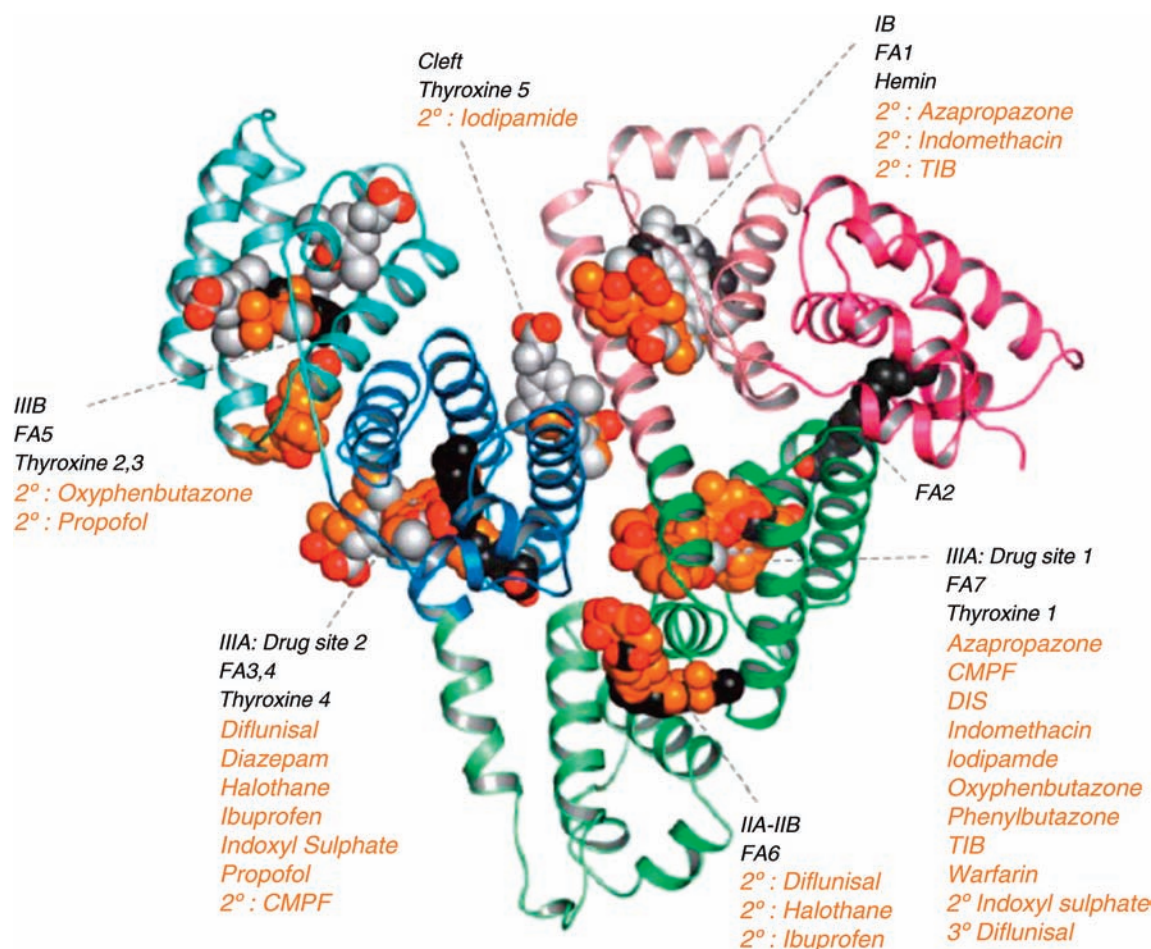


FIGURE 54.2. Model for human serum albumin (HSA). Some of the known binding sites for diverse drugs are indicated. These recognition sites may act in an enantioselective way, thereby resulting in chromatographic enantioseparation when HSA is used as CS.

(Reproduced with permission from: Reference 27. Copyright © 2005 Elsevier.)

to this feature, the many existing possibilities to modify selectivity contribute to broaden the scope of application. The concentration, pH, and nature of the buffer, together with the concentration and nature of the organic modifier, are contemplated among the variables to be set when looking for the most adequate chromatographic conditions.

Given that aqueous mobile phases with added organic modifiers at low concentrations are common chromatographic conditions, one main advantage of protein-containing CSPs is their compatibility with bioanalytical applications.²⁸ Also, general procedures can be easily transformed into MS-compatible methods by adapting the kind of buffer used. Although method development strategies have been studied,²⁹ optimization of the analytical conditions is not always easy to rationalize as slight modifications may have a strong effect on separation.

Simultaneously to their broad applicability, protein-containing CSPs show an extremely low loading capacity. Given their molecular size, the density of CS molecules on the CSP is low. Moreover, considering that the number of recognition sites per molecule of CS for a given analyte is limited, samples have to be prepared at a concentration lower than conventional to prevent saturation. Consequently, detection and sensitivity may be affected. Also, this characteristic makes protein-derived CSPs inadequate for preparative separations. Additionally, irreversible denaturalization and biodegradation susceptibility are important issues when working with protein-derived CSPs. Factors such as pH, content of organic modifier in the mobile phase, and working temperature have to be set within certain limits to preserve the integrity and therefore the enantioselective behavior of the protein acting as CS.

54.3.2. Polysaccharide Derivatives as Chiral Selectors

Polysaccharides, the most abundant biopolymers in nature, have also been used in chromatography as CS. Although intrinsically chiral, the materials used for this purpose are polysaccharide derivatives. Among them, esters and carbamates of cellulose and carbamates of amylose, in particular the 3,5-dimethylphenylcarbamates of either of them, are the most popular. When the CSPs are constituted by a silica gel matrix onto which the CS is simply coated, the composition of the mobile phase is limited to those solvents that do not solubilize the polysaccharide derivative. Mixtures of a hydrocarbon, hexane, or heptane, with an alcohol, usually 2-propanol, methanol, or ethanol, are common mobile phases. Although aqueous mobile phases can be used together with acetonitrile or methanol, these conditions tend to provide lower enantioselectivity values.³⁰

In the past, Daicel Chemical Industries Ltd (Japan) was the only provider of these CSPs resulting from the research of Professor Okamoto's group at Nagoya University.³¹ The

expiration of Daicel patents resulted in a broad range of analogous CSPs from diverse manufacturers presenting similar chromatographic behavior. The main differences among them are the result of particularities of the silica gel used as a matrix, the coating procedure employed, and/or the amount of CS on the matrix.³²

After long investigations by different research groups, recently, the limitation imposed by the solubility of the CS has been overcome by the launch of CSPs on the market in which the CS is chemically fixed onto the chromatographic matrix.^{33,34} These CSPs of increased stability can be used in association with a broader range of mobile phase compositions, comprising dichloromethane (DCM), methyl *t*-butyl ether (MTBE), tetrahydrofuran (THF), or ethyl acetate (EtOAc), all of them incompatible with coated phases. Given that enantioselectivity depends on the chemical environment in which the association CS-analyte takes place, the broader choice of solvents results in an increased probability to obtain separation for a particular analyte. Nonetheless, despite the evident advantages, it has to be taken into account that the immobilization process, kept undisclosed by the manufacturer, alters the enantioselectivity of the resulting materials with respect to that of the coated CSP containing the same CS.³⁵ Therefore, although the application domain remains in the same range, the occurrence of changes in the separation of racemates—previously resolved on coated phases, not resolved or fixed, or vice versa—is not unlikely.

Attempts to elucidate the recognition mechanism acting in polysaccharide-derived CSPs have been made.³⁶ However, despite the powerful computational modeling methods, and spectroscopic techniques available at present (NMR, X-ray diffraction (XRD), vibrational circular dichroism (VCD), attenuated total reflectance infrared spectroscopy (ATR-IR), among those more frequently used), it remains unknown at the level required for prediction (Figure 54.3).³⁷

Nevertheless, some considerations can be made in this respect. First, the fundamental helical structure of the polysaccharide provides different sites able to act as enantiorecognition sites for structurally diverse analytes. The arylaminocarbonyl or arylcarbonyl groups incorporated into the fundamental skeleton of the polysaccharide play a significant role in amplifying enantiorecognition. These groups, regularly distributed on the helical structure, generate binding pockets in which analytes can establish π -interactions and/or hydrogen bonds with the CS.^{39,40} Also, the groups on the aromatic substituents modify enantioselectivity by their electronic and/or steric effect, which explains the differences in stereoselectivity for the diverse CS available (Figure 54.4). Second, this fundamental structure is repetitive, thereby providing multiple identical recognition sites per a given mass of polymer in the CSPs.

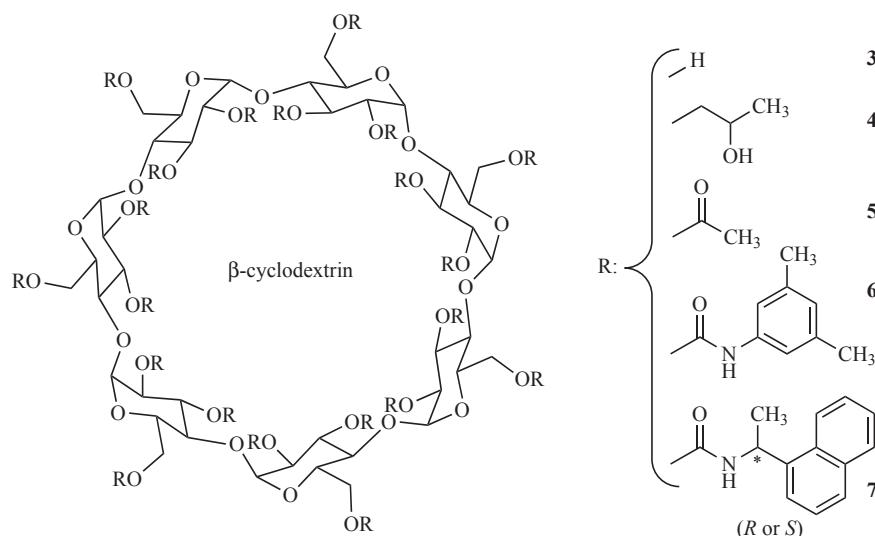


FIGURE 54.5. Structures of some cyclodextrins available as CS in HPLC.

diversity of techniques including GC⁴³ and capillary electrophoresis (CE).⁴⁴ Also, several commercially available CSPs exist for HPLC (Figure 54.5).⁴⁵

One of the main features of the CSPs containing cyclodextrins is the possibility to operate in different chromatographic conditions. The most common *normal* (organic lipophilic solvents as a mobile phase) and *reversed-phase* conditions (polar aqueous mobile phase) and the so-called *polar organic* mode (polar organic solvents in the mobile phase, which does not contain water) can be applied. This is possible thanks to the robustness of the CSPs in which the CS is covalently bonded onto the chromatographic matrix.

The diverse types of elution conditions foster diverse enantirecognition mechanisms. In general terms and considering native cyclodextrins, in reversed-phase conditions, inclusion of lipophilic groups of the analyte in the lipophilic cavity of the CS is favored. When lipophilic solvents are used in the mobile-phase, polar interactions between polar groups in the analyte with the external zones of the CS are promoted. Also, the size of the cavity determines the analytes that can be recognized by inclusion. For drug-like molecules, β-cyclodextrin **3** is the most used. Also, derivatization provides additional points of interaction with solutes and modulates accessibility to the lipophilic cavity, thereby determining differences in enantirecognition with respect to the corresponding native cyclodextrins.⁴⁶

Some glycopeptide antibiotics, such as vancomycin **8**, teicoplanin **9**, and ristotecin A, introduced by Prof. D. W. Armstrong, provide highly versatile materials when included as CSs in CSPs.⁴⁷ These molecules of outstanding structural complexity have a highly functionalized basket-like shape of considerable rigidity (Figure 54.6). As for cyclodextrins, inclusion in the cavity is possible. However,

in glycopeptides, this cavity does not impose on analytes the strict restrictions in size observed for cyclodextrins. Moreover, the diversity of chemical functions justifies the broad application domain. These functions provide a number of interacting possibilities with analytes.

Like cyclodextrin-derived CSPs, the multimodal character of antibiotic-derived CSPs allows for adapting conditions to a wide range of analytes. A broad enantirecognition ability is possible by tuning enantirecognition mechanisms.⁴⁹ Thus, in *reversed-phase* conditions, the inclusion of analytes in the lipophilic basket is promoted, while in *polar organic mode*, electrostatic, dipolar, and hydrogen bond interactions are more significant. *Normal phase* conditions and the new *polar-ionic mode* are also possible. The latter consists of the use of an organic salt, such as ammonium acetate, or alternatively an acid and a base, in an organic solvent such as methanol. These conditions allow the user to control the effect of ionizable functions, either on CS or on analytes, on retention and recognition.

It is known that crown-ethers may be involved in the formation of inclusion complexes for cations.⁵⁰ In contrast to cyclodextrins, the cavity determined by the oxygen atoms acting as electron-donating groups for complexation is highly polar. The inclusion of solutes is the result of the establishment of multiple hydrogen bonds between cationic groups in the analyte and oxygen atoms in the crown-ether backbone. Therefore, CSPs containing chiral crown-ethers as CSs are particularly adapted to compounds possessing primary or secondary amino groups close to stereogenic centers, such as amino acids and their derivatives, primary amines, and amino alcohols (Figure 54.7).

Considering their recognition mechanism, elution conditions should ensure the protonation of amino groups on

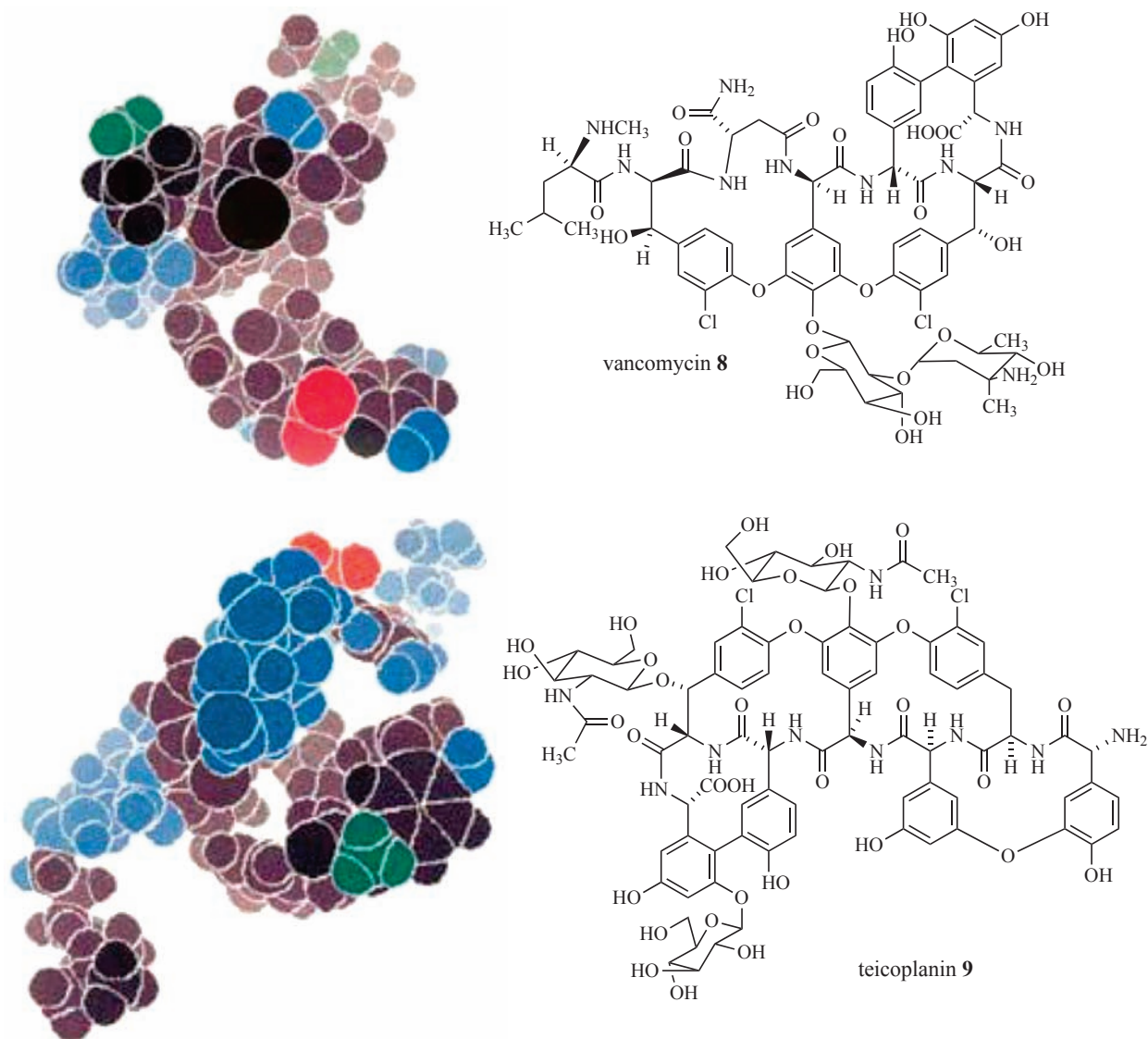


FIGURE 54.6. Structures of vancomycin and teicoplanin, glycopeptides used as CS in HPLC. In green, positively ionizable groups (amino); in red, negatively ionizable groups (carboxylate); and in blue, polar groups (hydroxyl bearing structures). (Adapted from Reference 48. Copyright © 2003 Springer-Verlag.)

analytes by including some acidic additive. Moreover, in certain cases, the physically immobilized CS (coated) may constitute a limitation in the choice of appropriate eluting conditions. As a result, the most applied eluting conditions correspond to reversed-phase mode, which ensures the stability of the CSPs.⁵¹

54.3.4. Low-Molecular-Weight CSs

Many chiral low-molecular-weight compounds have been tested as CS in chromatography resulting in a considerable number of CSPs. One main advantage of these CSPs is their

robustness and chemical stability, which is a consequence of the covalent bonding of the CS to the chromatographic matrix. The possibility to have available the two enantiomeric forms of the CS, when it is synthetic in nature, provides the opportunity to obtain CSPs with identical enantioselectivity but opposite eluting profiles. This property is of outstanding interest in the analysis of enantiomeric impurities. On such occasions, it is convenient to produce the elution of the minor enantiomer before the main component. The distortion effect caused by the tail of the main peak on the determination of the minor compound, when it is eluted after the major enantiomer, can be thus

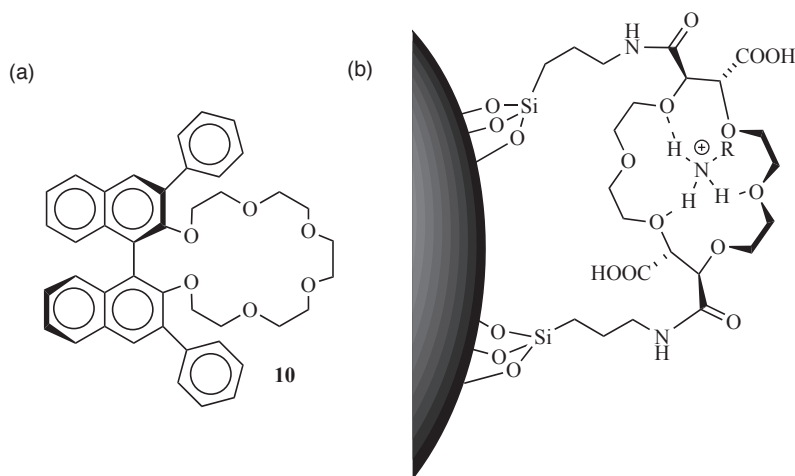


FIGURE 54.7. Structures of some chiral crown-ethers used as CS. While **10** (a) is used physically insolubilized (coated) onto the chromatographic matrix, similar compounds (b) are covalently bonded to it.

avoided. Also the structural simplicity of CSs makes them a useful tool in studies about the enantioselective recognition mechanism.^{52–54} Unfortunately, with only some exceptions, the applicability of this type of CSPs is limited.

Several types of CSPs containing low-molecular-weight CSs can be considered. Among them, “brush type” CSPs—“multiple interaction” or “Pirkle CSPs”—in which a π -stacking interaction governs recognition, constitute a numerous group. In Figure 54.8, the CSs of some of the most popular are shown. Brush-type CSPs are generally used in normal phase conditions because in reversed-phase mode, enantioselectivity is highly reduced.⁵⁵ This feature illustrates the significance that hydrogen bond interactions have on

recognition. Water acts by solvating the possible points of interaction between CS and analytes resulting in a decreased enantioselectivity. The CSP commercialized under the trade name Whelk-O (Regis Technologies, Inc., Chicago, IL; **14**; Figure 54.8) constitutes a noteworthy exception to this general rule.⁵⁶

Although natural in origin, the alkaloids quinine and quinidine, which are extensively used in enantioselective organic synthesis as organocatalysts, are also used as CS in chromatography. For this purpose, derivatives containing a bulky carbamoyloxy group on position 9, aimed to increase enantioselectivity, are bonded to silica gel (Figure 54.9). Given the basic character of these CSs, the resulting CSPs

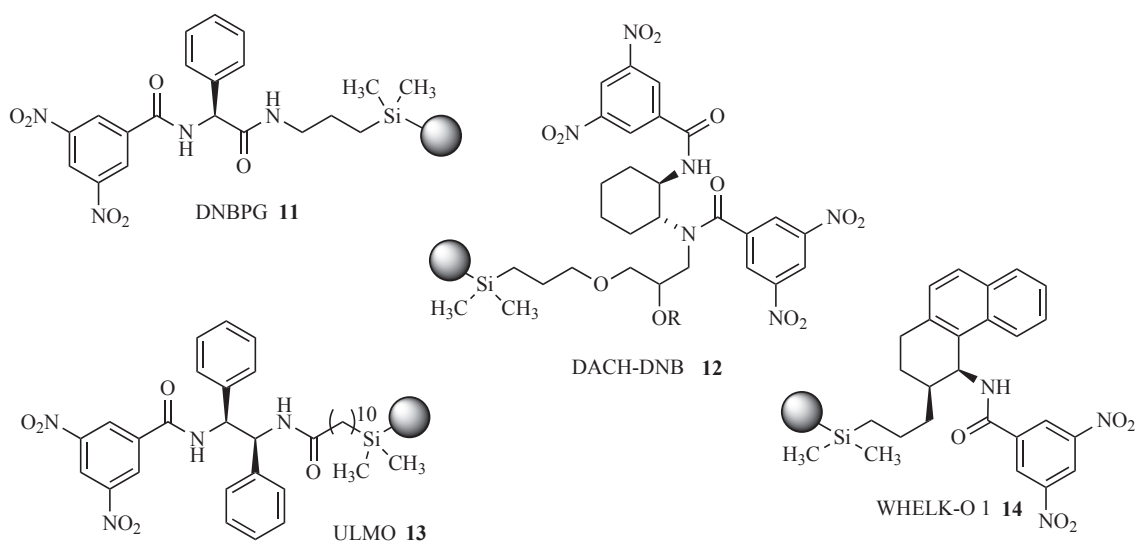


FIGURE 54.8. Structures of some brush-type CSPs.

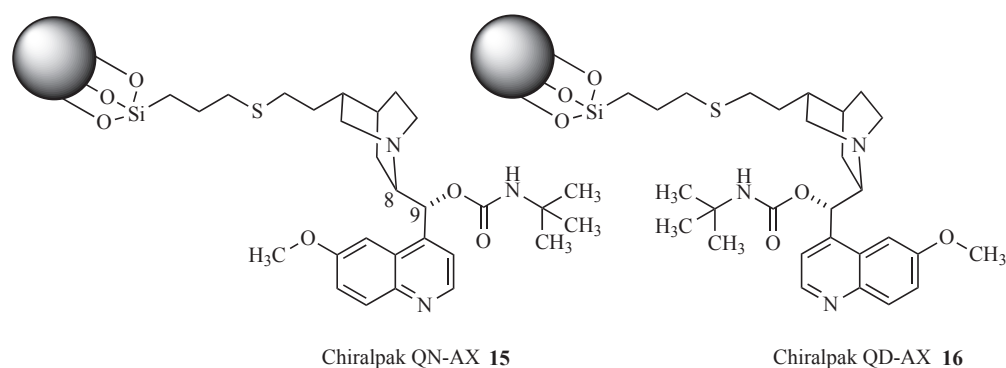


FIGURE 54.9. Structures of quinine (8*S*, 9*R*) **15** and quinidine (8*R*, 9*S*) **16** derived CSPs in which the diastereomeric character of the CSs can be observed.

are used as weak anion exchangers (WAXs). After protonation, the amino group on the quinuclidine bicycle forms ionic pairs with anionic counterions.⁵⁷ Many chiral acidic compounds, either carboxylic, sulfonic, or phosphonic acids, can be resolved using these CSPs.

An interesting feature of the quinine/quinidine pair, also observed in other contexts, is the reversal recognition of enantiomers. Despite the diastereomeric relationship between these two alkaloids, the elution order of enantiomers is often reversed in quinidine-derived CSP with respect to quinine-derived. Nevertheless, in general terms, enantio-separation values differ in magnitude for the same analyte. These CSPs are generally used in reversed-phase conditions or polar organic mode. 2-Arylpropionic acids of anti-inflammatory character (profens) are successfully resolved among other pharmacologically relevant acids.^{58,59}

Also within this group and among the first to be studied,^{60,61} CSPs for ligand-exchange chromatography

(LEC) can be considered. The recognition mechanism in these CSPs involves the exchange of ligands on a metallic complex constituted by a metal atom, which is incorporated into the mobile phase, the CS, and the analyte. Therefore, the presence of chemical functions able to chelate metals on the analyte and on the CS is essential for LEC. Analytes should possess structural bidentate or tridentate motifs comprising groups such as hydroxyl, amino, or carboxyl such as those on α - or β -amino acids, amino alcohols, and α -hydroxy acids and their derivatives. As metallic ions, Cu (II) and Ni (II) are preferably used, and CSs derived from L-proline or hydroxyl-L-proline are common, although *N,N*-dioctyl-L-alanines or penicilamines have also been frequently used.

54.3.5. Synthetic Polymers as Chiral Selectors

Chiral polymers are used as CSs in chromatographic enantioseparations after being either coated or covalently

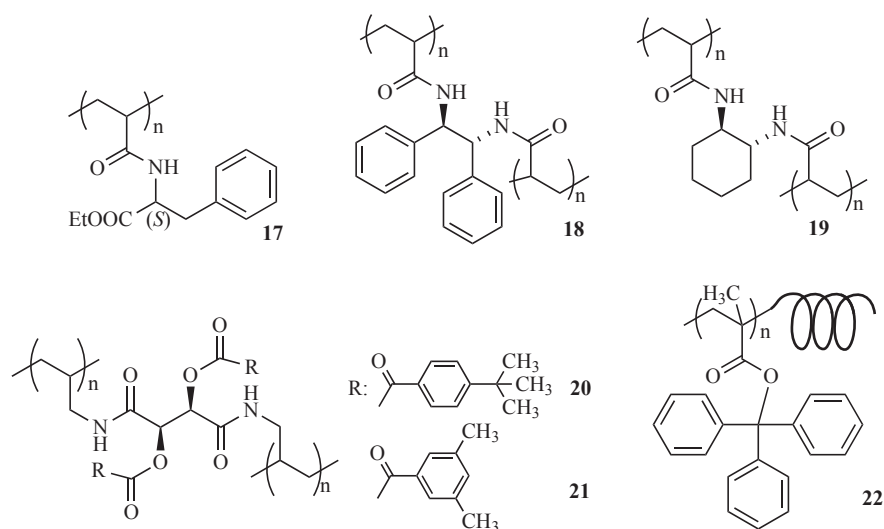


FIGURE 54.10. Structures of some polymeric CSs.

bonded onto a chromatographic matrix. The polymerization of chiral acryl or methacryl amides in the presence of a cross-linking agent originates chiral polyacryl or polymethacryl amides, like **17**, **18**, and **19** (Figure 54.10).^{62,63} Also the polymerization of chiral allylamides originates chiral polymers. Among them, L-tartrdiamide polymers **20** and **21** have been revealed to be useful as CS.⁶⁴ Usually the CSs in these CSPs are covalently bonded to the matrix, thereby providing the resulting CSPs with an outstanding chemical stability. Normal phase conditions are the most commonly applied elution mode.

Among the CSPs containing a polymeric CS, those having polytriphenylmetacrylates (PTrMA) such as **22** coated on the matrix deserve special mention because of their particular selectivity.⁶⁵ These chiral polymers are obtained by the polymerization of achiral monomers in the presence of a chiral catalyst. The bulky triphenylmethyl groups promote the adoption of a helical secondary structure by the resulting polymer. The chirality of this helix is determined by the catalyst used in the polymerization reaction. Chiral analytes difficult to resolve on other kinds of CSPs given their low functionalization have been successfully resolved using these CSPs. Among them aromatic compounds with helical chirality are separated. Unfortunately these polymers, which have a certain sensitivity to hydrolysis, are simply coated on the silica matrix. This feature limits to hydroalcoholic mixtures the type of compatible mobile phases.

The multiplicity of recognition sites determines one of the characteristics of polymeric CSPs. These materials are provided with a significant loading capacity, which is what makes them suitable for preparative applications.

54.4. UNDERTAKING AN HPLC ENANTIOSEPARATION

The increasing and generalized use of HPLC for enantioseparation has popularized practices previously considered exceptional and uncommon for chromatographers. Once established, conventional HPLC involved almost exclusively the use of a lipophilic stationary phase—C18 is the most universally used—together with mixtures of a polar organic solvent—ACN or MeOH—with an aqueous buffer (reversed-phase mode) acting in a gradient of decreasing polarity. This way to proceed allows the user to modulate retention at any time during separation on the basis of the polarity of analytes with respect to that of the mobile and stationary phases. The use of alternative stationary phases or chromatographic conditions was almost anecdotic.

54.4.1. Choice of Stationary Phase

In enantioseparation, the situation is clearly in contrast to what was considered common in conventional HPLC

analysis. The concept of “universal” stationary phase does not exist. The number of CSPs on the market may be overwhelming for newcomers to the subject⁶⁶ even though many of them are simply versions of the same with a different brand name. The first question to answer is, therefore, as follows: Which is the appropriate column to our needs? Given the considerable price of chiral columns, the approach followed to answer this question may differ slightly depending on the interests and possibilities of each laboratory. Thus, in a control department, dealing repetitively with the same few products, durability and robustness are important features to consider; whereas in a research department, in which the variety of structurally diverse products to handle can be wider, having a broad application domain is imperative for a suitable CSP. Additionally, if a preparative separation is envisaged, loading capacity and availability will be factors to take into account in the choice of the most appropriate CSP.

In general, the analysis of enantiomers starts with a screening process on the basis of a trial-and-error approach. A typical screening involves between four and eight columns including most commonly polysaccharide-derived (Figure 54.4), cyclodextrin-derived (Figure 54.5), antibiotic-derived (Figure 54.6), and Whelk-O (brush-type) (**14**, Figure 54.8) CSPs. The inclusion in the chromatographic system of two software-controlled multiple-port valves, before and after columns, allows the automation of the process (Figure 54.11A). Nevertheless, the test performed in a sequential manner may be time-consuming, considering that several conditions have to be tested in each column for each analyte.⁶⁷

In an attempt to overcome this limitation and make the search for chromatographic conditions more compatible with high-throughput processes, several alternatives have been described.⁶⁸ Often these approaches involve the use of specially adapted chromatographic systems that permit a parallel instead of a sequential test of several CSPs.^{69,70} Among them the Sepmatix system (Sepiatec, Berlin, Germany) allows the user to screen in parallel up to eight columns with a combination of 24 different solvents (Figure 54.11B). This approach results in a reduction in the time invested in the choice of CSP and search of conditions into less than one fourth of the usual when using a sequential screening.

The application of screening tests in solution constitutes a quicker and cheaper alternative when facing enantioseparation for a new compound.^{71,72} Although these tests allow for addressing the attention to particular CSs, they do not save having to test the chosen CSP and to determine the adequate chromatographic conditions for analysis. Among other possible limitations,⁷³ the latter may explain the exceptional use of this approach.

At this point, it is worth mentioning the usefulness of ChirBase,⁷⁴ a database on enantioseparation conditions.

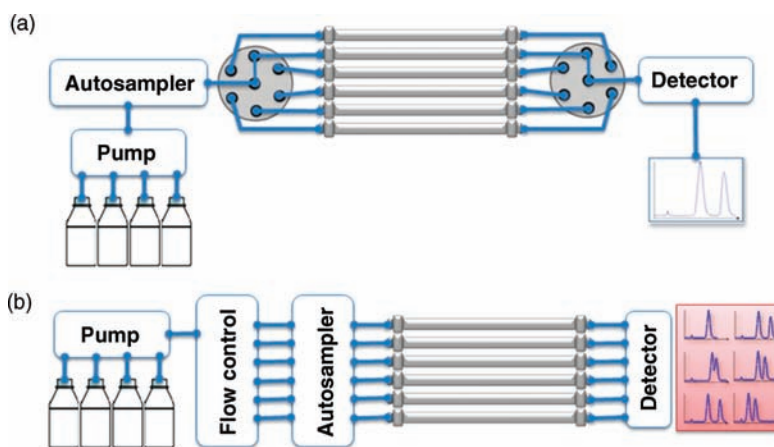


FIGURE 54.11. Choice of appropriate column and chromatographic conditions: (a) sequential approach and (b) parallel approach.

This database contains information about CSPs and conditions for HPLC and supercritical fluid chromatography (SFC) enantioseparations for more than 50,000 products. It is regularly updated by Prof. Christian Roussel and Dr. Patrick Piras (Aix-Marseille Université, France) with published and unpublished results.⁷⁵ ChirBase contains also conditions for GC and CE enantioseparations, which are updated by the group led by Prof. B. Koppenhoefer (University of Tübingen, Germany).

54.4.2. Choice of Mobile Phase

In HPLC enantioseparation, the mobile phase not only provides the control of eluting time for analytes but also acts in a specific way on the enantiorecognition process. For certain CSPs, the mobile phase provides the particular environment in which recognition can be produced. This fact has promoted the popularization of elution practices alternative to those most commonly used in conventional HPLC. Again there are not “universally” applicable conditions. On the contrary, the choice of mobile phase composition often depends on the kind of CSP used.

HPLC chromatographic enantioseparations are usually performed isocratically. Given that enantiomers have the same polarity, a change in the polarity of the mobile phase affects equally the two of them. Separation is not favored by gradient elution, and it may be even impaired by the decrease in affinity between analyte and CSP. In contrast, isocratic elution emphasizes the differences in the association of enantiomers with the CS in the stationary phase. Nevertheless, gradient elution is sometimes applied with the aim to speed up the search for appropriate stationary and mobile phases.⁷⁶ This approach is not exempt of controversy. Some authors indicate that this practice is not advantageous if the time required to re-equilibrate the

column in starting conditions after each run is considered. Anyhow, it has to be kept in mind that peak separation will be maximal for isocratic elution.

Another common practice in HPLC enantioseparation is the use of organic solvents of low polarity as mobile phase components. Although, from the point of view of lipophilicity, the organic material bonded or coated onto the chromatographic matrix makes CSPs similar to C8, C18, or phenyl standard stationary phases, normal phase mode is often preferred over reversed-phase conditions. The use of a lipophilic solvent in a lipophilic environment favors dipolar interactions such as hydrogen bonding, dipole–dipole interactions, and π -stacking, while nonselective van der Waals interactions are minimized. As a result, the selective association CS–enantiomer is favored.

The solvents most commonly used for the mobile phase are mixtures of an alkane (hexane or the less toxic heptane) with a solvent of medium or high polarity. Their ratio will determine retention and, therefore, the possibility for the analyte to interact with the CS in the stationary phase. Given their compatibility with a range of CSPs either bonded or coated, alcohols are frequently included as polar components of the mobile phase (Figure 54.12a). Among them, 2-propanol is more extensively used than ethanol or methanol because of its full miscibility with alkanes. Viscosity, which impacts column back-pressure, is another of the reasons for limiting the use of high ratios of certain alcohols.

Regarding other solvents, the chlorinated chloroform and methylene chloride in mixtures with an alkane are also common in HPLC normal-phase enantioseparations. Although this kind of solvent is not compatible with coated CSPs, as neither are other less frequent solvents such as ethyl acetate, tetrahydrofurane, and methyl *t*-butyl ether, they may provide interesting enantioselective behavior to compatible CSPs.³³

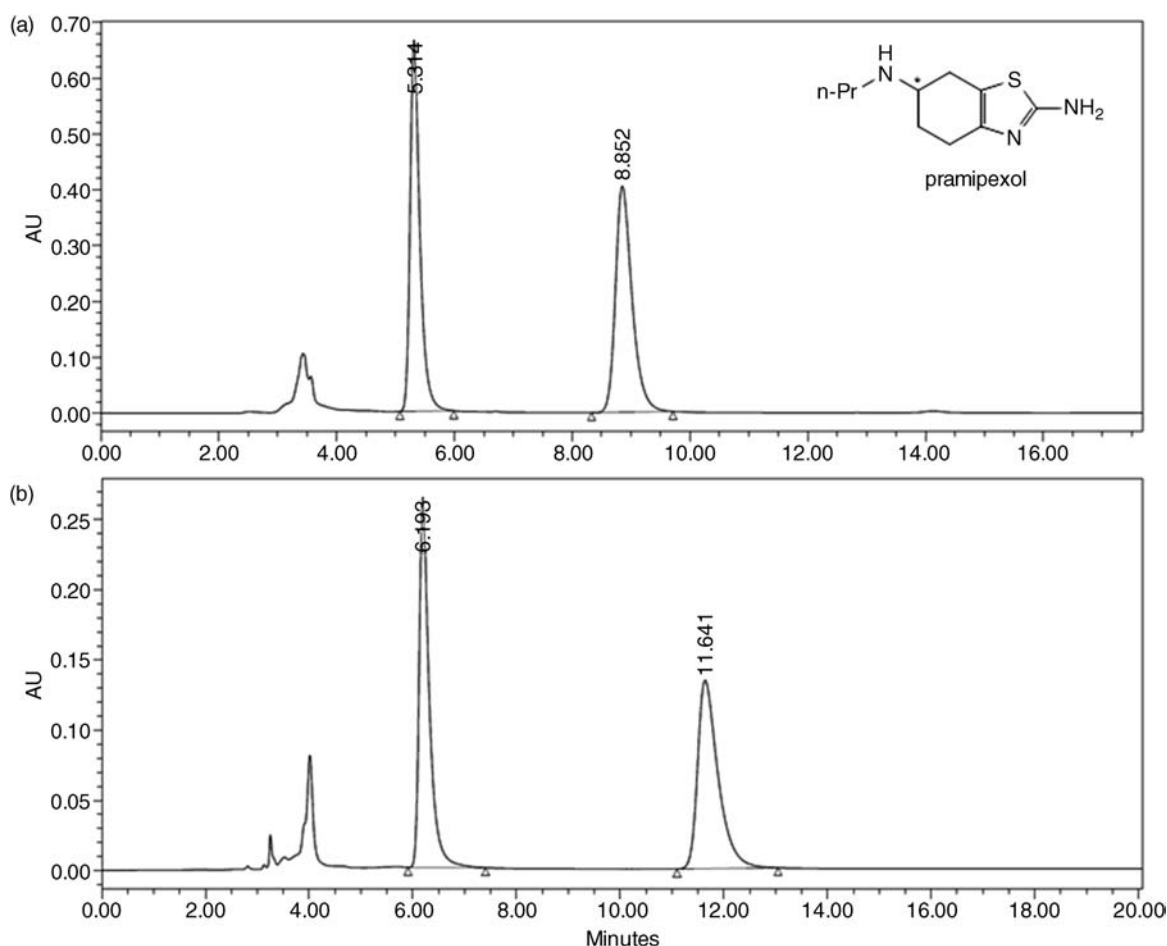


FIGURE 54.12. Separation of pramipexol enantiomers on Chiralpak IA using two different eluting modes. The elution order of enantiomers is the same in the two cases. The S isomer is the more retained: (a) normal phase: hexane/EtOH/diethylamine (70:30:0.1) and (b) polar organic mode: acetonitrile/MeOH/diethylamine (90:10:0.1).

Depending on applications, reversed-phase conditions may be preferred.⁷⁷ When compatible with the CSP used, this is the mode of choice in the analysis of aqueous samples, with biological samples (plasma, urine) among them. Also for practical reasons, analytical departments in companies may prefer reversed-phase mode when optional. If the same HPLC system has to be used for diverse purposes, as most commonly HPLC systems are running in such conditions, to use them for enantioseparation saves the time and solvent that otherwise would have to be invested in changing mode. Moreover, this avoids locking a particular HPLC system in normal-phase mode, which are conditions only useful for certain applications. Unfortunately, some CSPs experience a significant decrease or even the complete loss of enantioselectivity when water is one of the constituents of the mobile phase. The ability of water to establish hydrogen bonds and to solvate polar groups involved in recognition is the reason for this observation.

In the presence of water, the solvated molecules of the analyte will be forced to compete with those of water in the interaction with the solvated CS on the CSPs. When hydrogen bond interactions play a fundamental role in the recognition mechanism, this results in a decrease of enantioselectivity.

On other occasions, the use of reversed-phase conditions is the only compatible eluting mode. This is the case for protein-derived and ligand-exchange CSPs. In the former, the mobile phase is always buffered and the amount of organic modifier (2-propanol, ethanol, or acetonitrile, for instance) constitutes only exceptionally over a 15% (v/v) of the mobile phase composition. In ligand-exchange CSPs, the need for Cu (II) or Zn (II) ions imposes the aqueous nature of the mobile phase, which is also complemented with a certain percentage of a miscible organic modifier.

In addition to these two classic eluting modes, other alternative conditions are being increasingly applied.

Among them, the *polar organic* mode consists of a polar organic solvent, such as acetonitrile, alcohols, or their mixtures (Figure 54.12b). The absence of water is the characteristic feature of this mode. Such conditions are compatible with a number of CSPs. Given that solvent mixtures of this kind can be easily manipulated in large amounts, reused, more affordable, and less toxic than hydrocarbons or chlorinated solvents, they are particularly adequate for preparative separations.

Several types of CSPs are compatible with a diversity of eluting modes. As mentioned, those containing cyclodextrins and antibiotics as CSs are the most versatile.^{78,79} These are known as multimodal CSPs. The alternative recognition mechanisms acting in the alternative eluting modes result in an increase of the possibilities to obtain separation. Also, conditions in which the elution order of enantiomers may reverse are possible.⁸⁰ Although this is a clear advantage, it has to be taken into account that the wider choice of possible eluting conditions may increase the time needed to optimize separation.

54.4.3. Use of Additives

The addition of organic acids or bases, for acidic and basic analytes, respectively, at a low concentration (usually 0.1–0.2% v/v) is a common practice in enantioseparation, even when normal phase conditions are used. The most conventionally used additives for this purpose are acetic or trifluoroacetic acids and diethyl- or triethylamine as bases, although ethanolamine and ethylenediamine are also frequently used (Figure 54.12). The role of these additives is to prevent ionization of ionizable analytes. When CSPs containing nonionizable CSs, such as polysaccharide derivatives or brush-type CSs, are used, the result is an improved interaction between neutral CSs and enantiomers and an increased efficiency (thinner peaks).

The simultaneous use of acidic and basic additives (triethylamine and acetic acid, for instance) is also possible. This practice allows for improving efficiency and resolution for zwitterionic analytes or for those that, even if neutral, establish strong polar interactions with the CSP.

Alternatively, some CSPs containing ionizable CSs act enantioselectively on reversed-phase conditions. This is the case for protein- and antibiotic-derived CSPs. In such cases, buffered solutions are used in the mobile phase to control ionization on both CS and analyte by adjusting pH. In protein-derived CSPs, the concentration and pH of the buffer are usually set into certain limits to avoid denaturalization of the protein. Buffer concentration is rarely fixed over 100 mM in all instances. However, the pH range greatly depends on the particular protein acting as CS. Considering the allowed range, pH is generally adjusted to shift the equilibrium toward the completely ionized product. As for the nature of the buffer, among others, borate and phosphate

buffers are commonly used. At present, as a result of the spread of mass spectrometers as HPLC detectors, there is a need to develop compatible methods, which can be decisive in the choice of buffer.²⁹

On other occasions, recognition requires adequate characteristics either in the CS or in the analytes that have to be provided by the mobile phase. Thus, when ligand-exchange CSPs are used, copper salts have to be added to the aqueous mobile phase. Also, when the separation of amines on CSPs containing crown-ethers as CSs is undertaken, an acid is added to the hydro-alcoholic mobile phase to ensure ionization of the analyte. Analogously, acidic hydro-alcoholic mobile phases are used with ion-exchange CSPs to foster protonation of the CS.

Organic acids and bases, or even volatile organic salts (ammonium acetate, triethylammonium acetate, ammonium trifluoroacetate, ammonium formate), can be also added to nonaqueous polar solvents. These are the so-called *polar-ionic* conditions, which are frequently compatible with MS detection.⁸¹ Also, in this case, the presence of additives allows controlling ionization on either CS or analytes.

Aware of the variety of conditions possible, and to help in the task of choosing the appropriate mobile phase for the separation of interest, suppliers of CSPs usually provide tips and decision-tree schemes for method development procedures.^b Also, diverse authors have published studies on the subject. This is the case for polysaccharide-derived CSPs,^{33,82} cyclodextrin-derived CSPs,⁸³ antibiotic-derived CSPs,⁸⁴ and protein-derived CSPs.²⁹ As a general rule, starting conditions are applied to set retention of the analyte, and in the next step, enantioselectivity is tuned by stepwise modifying appropriate factors, considering the chemical nature of the analyte, compatibility with the chromatographic support, and recognition mechanism acting in the separation.

54.4.4. Temperature

Chromatographic enantioseparation can be affected by temperature as any other chemical process based on the association of chemical species.⁸⁵ To explain how temperature affects enantioseparation, the thermodynamics of the equilibrium process in the complexation CS-enantiomer has to be considered.²⁴

^bThe following links provide method development strategies for some kinds of CSPs (this is not an exhaustive list) (links last accessed in February 2012): <http://chiral.newsroomhq.com/resource-center.html> <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/chiral-chromatography/learning-center/publications.html> http://www.registech.com/Library/Regis_Chiral_Users_Guide.pdf <http://www.registech.com/Library/ChiralGuide6.pdf> <http://www.registech.com/Library/sfcappguide2006.pdf>

Assuming a single enantiomer (*R*) and taking equation (2):

$$R + CS \xrightleftharpoons{K_{aR}} R - CS; \quad \Delta H_R^\circ - T\Delta S_R = -RT \ln K_{aR} \quad (2)$$

that is:

$$\ln K_{aR} = -\frac{1}{T} \frac{\Delta H_R^\circ}{R} + \frac{\Delta S_R}{R} \quad (9)$$

This expression is the van't Hoff equation that relates the association constant of the considered enantiomer with the CS (K_{aR}) to entropic and enthalpic terms as a function of temperature. As association takes place on the chromatographic stationary phase, equation (4) can be considered and combined with equation (9):

$$k'_i = K_{a_i} \frac{V_{SP}}{V_{MP}} = K_{a_i} \phi \quad (4)$$

where k'_i is the capacity factor (retention factor) for compound *i* and ϕ is the phase ratio. Thus, for one of the enantiomers (*R*):

$$\ln k'_R = -\frac{1}{T} \frac{\Delta H_R^\circ}{R} + \frac{\Delta S_R}{R} + \ln \phi \quad (10)$$

On the basis of this expression, the thermodynamic quantities can be deduced by measurement of the chromatographic retention over a range of temperatures. Generally, the plotting of $\ln k'$ versus $1/T$ determines a straight line. The slope of this line provides information on the enthalpy change produced by the absorption of the analyte on the CSP while the intercept informs about the entropy change. When the same representation is applied to the two enantiomers, two intersecting lines are obtained in most occasions (Figure 54.13). Exceptionally, other phenomena such as enthalpy not depending on temperature, or nonlinear van't Hoff plots, have also been observed. Although the interest of the latter is undeniable for mechanistic studies, applicability to everyday separations is scarce.

Around room temperature, the chromatographic enantioseparations used are enthalpically driven. That is, the second eluted enantiomer forms a more stable complex with the CS, even if the entropy change is unfavorable (restriction of mobility and/or conformational freedom in the adsorbate, for instance). In this scenario, an increase in temperature produces a decrease of enantioseparation. Therefore, in general terms, a decrease in temperature can be of help in the optimization of poorly resolved enantiomers.

Following the aforementioned tendency, there is a certain temperature at which the two enantiomeric peaks

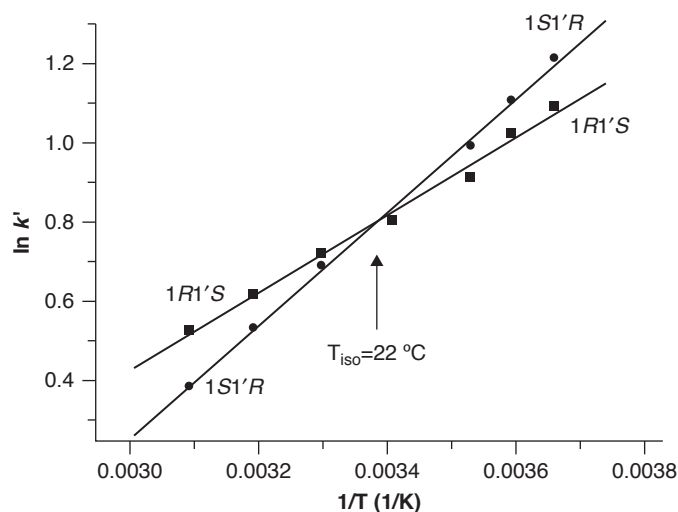


FIGURE 54.13. Plot of $\ln k'$ versus $1/T$ for two enantiomers in the temperature range 5°C to 50°C for given chromatographic conditions.

(Reproduced with permission from Reference 86. Copyright © 2011 Elsevier B.V.)

coelute. It is the so-called *isoelutotropic temperature* (T_{iso}). At this point, the enthalpy term is compensated by the entropy term of the equation. Often T_{iso} falls out of the temperature range most commonly tested in liquid chromatography. Therefore, usually the isoelutotropic temperature is not experimentally determined but calculated by extrapolation of the two intersecting lines. Beyond T_{iso} , enantioseparation is entropically driven and reversal of elution order is observed. This phenomenon is not exclusive of liquid chromatography. On the contrary, it was first described for gas chromatography enantioseparations^{87,88} and then observed in supercritical fluid chromatography.⁸⁹

Although attractive, thermally induced inversions of elution order at affordable temperature ranges are not frequent.^{90,91} Therefore, temperature cannot be considered a general parameter to be set in order to reverse the elution order of enantiomers in liquid chromatography. In this respect, a procedure to obtain the inversion in the order of elution has been described.⁹² The method is based on using two different temperatures within the same run and on reversing the flow of the mobile phase between the two conditions. The change in flow direction and temperature has to be performed just before the elution of analytes. This strategy is applicable to compounds in which enantioselectivity is strongly dependent on temperature.

Another interesting temperature-related phenomenon is the enantiomerization of isomers in compounds showing a low enantiomerization barrier. On these occasions, enantioselective chromatography can be a useful tool in determining energy barriers^{93,94} (Figure 54.14).

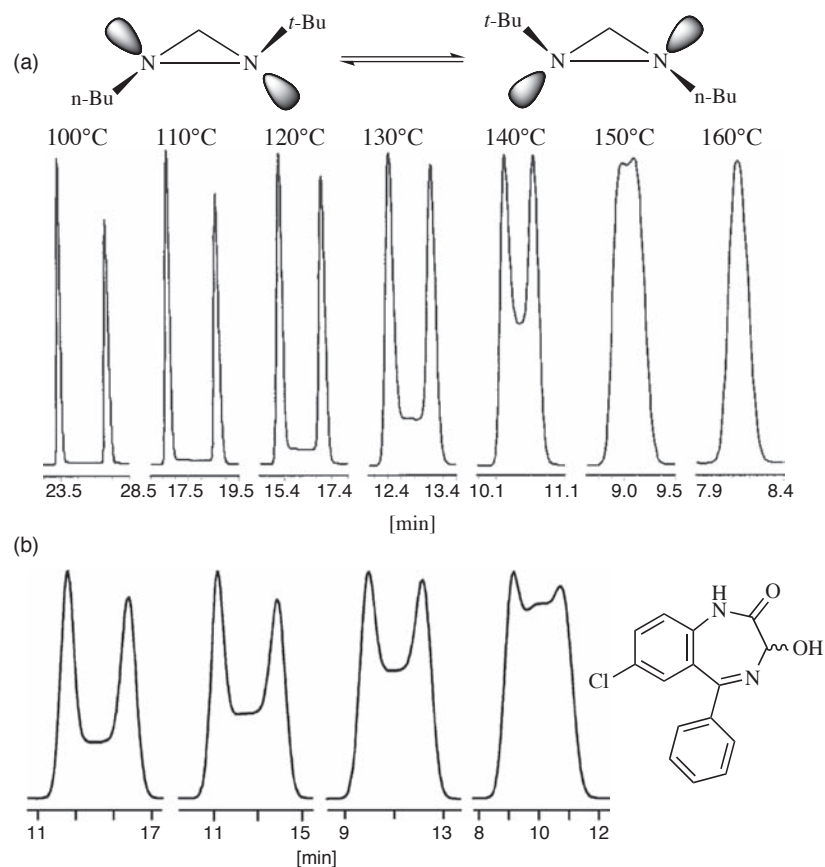


FIGURE 54.14. Characteristic chromatographic peaks obtained for interconverting species: (a) enantiomerization of 1-*n*-butyl-2-*t*-butyldiaziridine: GC conditions, 25-m Chirasil- β -Dex, He as carrier gas. (Reproduced with permission from Reference 95. Copyright © 2006 Wiley-Liss, Inc.) (b) Enantiomerization profiles for oxazepam: DHPLC conditions, NucleoDex- β -PM, 10-mM phosphate buffer at pH 8.0. (Reproduced with permission from Reference 96. Copyright © 2002 Elsevier Science B.V.)

54.4.5. Equipment

Being an enantiomer does not provide specific qualities other than optical to conventional organic compounds. Therefore, their analysis does not impose any particular requirements with respect to equipment. Any HPLC apparatus, provided with the appropriate chiral column, can be used for enantiomer determination. Only the availability of some accessories, such as multiple port valves to permit the programmed test of several columns and mobile phases, can be of help to speed up the search and optimization of analytical chromatographic conditions.

In this context, detectors deserve a specific comment. Conventional HPLC detectors can be used without limitation on the basis of the enantiomeric character of the compounds to be analyzed. Actually, given that the two enantiomers have the same physicochemical properties, the response in particular conditions is the same for the two isomers. Only spectroscopic detectors in which the light used as the source is polarized can distinguish between enantiomers.

Depending on the property measured, these instruments can be classified into 1) *polarimetric*, when the deviation in the plane of polarized light is considered; 2) *optical rotation detectors* (ORs), which measure differences in refraction indices on right- and left-handed circularly polarized light^c; and 3) *circular dichroism detectors* (CDs), which detect differences in absorption for the right- and the left-handed circularly polarized light when it goes through the sample.

While polarimetric detectors usually use light sources in the visible-near IR region, OR and CD detectors use ultra-violet (UV) lamps. The sensitivity of the former is appropriate for the detection of sugars, but it is very low for many other chiral compounds (drugs and synthetic intermediates, for instance). As a result, polarimetric detection is less and less used. As refractive index (RI) detectors, OR detectors are broadly applicable. They do not require a chromophore

^c Plane polarized light can be considered the result of the addition of a left circularly polarized wave and a right circularly polarized light wave, whose amplitude is identical. <http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo0.htm>

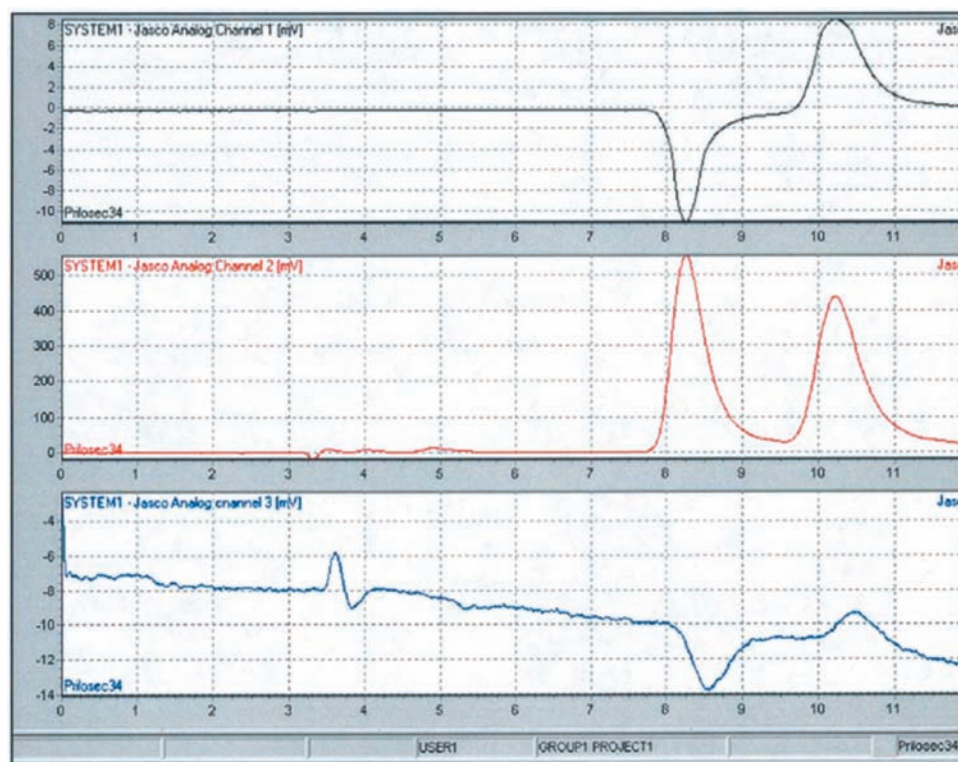


FIGURE 54.15. Prilosec (rac. omeprazole) HPLC chromatograms (ChiralPak AD, 100% EtOH). Top, CD detector; middle, UV detector; bottom, OR detector. (Reproduced with permission from Reference 97.)

on the analyte. As for conventional RI instruments, differences in refraction indices for polarized light are affected by temperature and solvent changes. Moreover, multiple optical effects in the flow cell, such as reflections and/or scattering, result in a partial depolarization of the source light, thereby decreasing sensitivity.⁹⁷ As a consequence, CD detectors, which measure absorption of light as conventional UV detectors, provide greater stability and higher sensitivity. These features make them preferred.⁹⁸ Nevertheless, it has to be taken into account that the analyte must have a chromophore group to be detectable in such conditions. CD detectors can also be used in UV conventional mode, just switching from polarized to nonpolarized UV light (Figure 54.15).

When enantiomers are irradiated with polarized light, they originate a response equivalent in intensity but opposite in sign. The previously described detectors allow the user to determine an elution order of enantiomers on the basis of the observed positive or negative signal. However, either intensity or even sign is dependent on the solvent used as a mobile phase. Thus, for different solvents, it is possible to detect either positive or negative peaks corresponding to the same isomer.^{99,100} Moreover, only on particular occasions is the knowledge of peak sign useful for assigning absolute configuration by comparison with

known compounds. As a consequence, in most cases, once enantioseparation has been established, analytical methods are developed using conventional detection techniques.

Nevertheless, in particular, when dealing with complex mixtures to be analyzed and depending on the nature, origin, and character of the sample, the application of CD detectors may be convenient. Chromatograms will become thereby simplified as only optically active substances are detectable.

54.5. ALTERNATIVE TECHNIQUES TO HPLC FOR ENANTIOSEPARATION

Since 2000, Prof. T. Ward and co-workers have been periodically authoring review articles on enantioseparation. The articles in this series, appearing with a periodicity of approximately one every two years,^{101–103} summarize the publications—written in the English language—on this subject in the considered period of time. These reviews can be used to assess the global significance of the diverse techniques and its evolution with time. The main sections in these publications are devoted to HPLC, GC, CE, SFC, and thin layer chromatography (TLC).

HPLC is without any doubt the most used technique over the whole period. At the time of writing this monograph, in the last appeared review,¹⁰³ HPLC accounts for 50% of all described separations in the period under examination, while 25% correspond to CE, leaving the remaining 25% to the rest of technologies considered. However, despite the HPLC predominance, depending on the nature of the analyte and that of the sample to be analyzed, other techniques may result that are more appropriate.

54.5.1. Enantioselective Gas Chromatography

Enantioselective gas chromatography was developed previously to liquid chromatography.¹⁰⁴ Although GC was already a well-established separation technique when the interest for enantioseparation experienced an exponential growth, there has not been an explosion in CSP diversity like that seen with HPLC. The applicability of this technique, which is limited to thermostable and volatile compounds, and the simultaneous development of HPLC enantioseparation, may explain this observation. Nevertheless, many CSPs for GC are on the market, with the most used being those derived from amino acids and from cyclodextrins.

As stated, GC is considered particularly adequate for volatile chiral compounds. Among them drugs, such as anesthetics^{105,106}; natural compounds, such as pheromones^{107,108} and terpenes^{109,110}; and a variety of products used as flavors and fragrances¹¹¹ can be encountered. On these occasions, enantioselective GC constitutes a convenient alternative to HPLC in the determination of the enantiomeric content in samples.

Achiral derivatization previous to GC analysis is frequent to increase volatility. This allows for an increase in the range of products in which the technique can be applicable. In this context, analogously to conventional GC, lipophilic acids are classically analyzed after being converted into trimethylsilyl or methyl ester derivatives.^{112,113}

When compared with HPLC, the main advantages of GC apply also to enantioseparation. Thus, GC enantioseparation is highly efficient (narrow peaks), which results in a high resolution. Also the process leading to the optimized separation method is easier than in HPLC. Temperature is the main parameter to be set in the optimization of chromatographic conditions. Runs can be performed in isothermal mode or in programmed heating ramp conditions. Better separations used to be obtained at lower temperature and higher linear velocity of the carrier gas. As a general trend, enantioseparation is rare at temperatures over 200°C. Consequently, to prevent analyte racemization and to increase the durability of the column, suppliers indicate a *maximum allowable operating temperature* for each column at around 220°C.

When coupled to MS, GC does a great step forward in its applicability. MS provides structural information of

analytes, which is what makes GC-MS perfectly suitable for the characterization of natural compounds and in the assessment of the authenticity of natural components in food and beverages.^{12,114}

Only the low loadability of GC constitutes a limitation. Thus, applicability in GC is restricted to analytical purposes. Therefore, when the final aim is to obtain isolated enantiomers from the mixture, although GC may be adequate to the physicochemical characteristics of the considered compound, HPLC conditions have the advantage of being adequate as a starting point in the scale-up of the separation.

54.5.2. Electromigration Techniques in Enantioseparation

A variety of related modalities are grouped under the term “electromigration techniques.” They share instrumentation and differ in the analytical conditions applied. Capillary electrophoresis (CE) is the most fundamental. In the broadest sense, CE separations are based on the different electrophoretic mobilities of charged species when an electric field is applied to the ends of a capillary. This basic setup was further complemented to cover not only charged species but also neutral compounds. In the latter, surfactants are used to form charged adsorbates with analytes. This is the so-called *micellar electrokinetic chromatography* (MEKC).¹¹⁵ Also, the capillary can be coated or filled with a chromatographic material. The presence of such material changes the migration mechanism of components in a sample by adding an adsorption process to the mentioned electrophoretic mobility. Additionally, pressure can be applied. In such conditions, capillary electrochromatography (CEC) is the appropriate designation for the technique.¹¹⁶ Although there are other varieties, the three above-mentioned modalities are the most significant.

The appearance of capillary electrophoresis in the mid-1980s coincided with a period of important expansion of enantioseparation techniques,¹¹⁷ and soon it was applied to the analysis of enantiomeric mixtures of the most diverse character.¹¹⁸ As in HPLC, a chiral selector, with the ability to recognize stereoselectively the enantiomers, has to be incorporated into the separative system. This CS is either added to the background electrolyte as an additional solute, acts as a chiral surfactant forming chiral micelles, or incorporated as a constituent of the chromatographic support, which is filling the capillary. The difference in mobilities observed for enantiomers is the result of the differentiated association between each one of them and the CS and/or the difference in mobility of the transient diastereomeric adsorbates formed.⁴⁴

A wide variety of CSs can be used in electromigration techniques. Among the most used, cyclodextrin derivatives neutral or charged^{119,120} together with macrocyclic

antibiotics¹²¹ hold an outstanding position. Their water solubility and stability in solution, together with UV transparency, are the properties that make them appropriate for this purpose. Cyclodextrins are also used in MEKC, often together with an achiral surfactant at a concentration above the critical micelle concentration (CMC).¹²² Alternatively, chiral surfactants such as bile acids or amino acid derivatives have been also applied.¹²³

In comparison with HPLC, CE techniques are better adapted to highly polar compounds, which are often difficult to analyze in chromatography. Additionally, analysis time in CE techniques is shorter than in HPLC and efficiency is higher than in the latter. Also, it is worth noting the low amounts of solvents (mainly alcohols) and buffers required and the minor volumes of sample needed. Despite all these evident advantages, CE techniques have not replaced HPLC in industrial applications. Although at present there is no doubt about the robustness of CE, the reticence of pharmaceutical companies to broadly use this technique may be related to its relatively poor limit of detection.

54.5.3. Supercritical Fluid Chromatography in Enantioseparation

Supercritical fluid chromatography (SFC) refers to the use of mobile phases at temperatures and pressures above the critical point (supercritical). SFC uses carbon dioxide as a main component in the mobile phase because its critical point (31.3°C, 7.39 MPa) is easy to reach. However, carbon dioxide is similar to alkanes in solvent strength and therefore unsuitable for the elution of polar compounds. This character is corrected by the addition of a significant amount of polar solvents, mainly alcohols, to increase the polarity of the mobile phase. In such conditions, the supercritical state is not actually reached. Often temperatures lower than the critical and pressure above the critical are applied. These are designated as subcritical conditions. Nevertheless, separations are performed indistinctively in super- or subcritical conditions.

One of the most interesting properties of SFC is the low viscosity of the mobile phase. This, together with the high diffusion coefficients for solutes, originates fast mass transfer and, as a consequence, higher efficiency and shorter analysis time than in HPLC. Nevertheless, the actual major advantage of SFC when compared with HPLC is the low solvent consumption, which is limited to the added organic modifier.¹²⁴ Moreover, CO₂ is viewed as a more environmental friendly compound than the organic solvents used in normal-phase HPLC.

On the contrary, the main drawback of SFC is the need for particularly adapted instruments that include a thermostated pump, to maintain CO₂ in supercritical conditions while pumped through the system; an oven to keep

temperature above 31.5°C; and a pressure restrictor, to maintain conditions until the end of the line, after the detector where pressure is released. As a result of the low viscosity of the fluid, the column back-pressure is low and high flow rates can be applied. This also contributes to lowering the analysis time with respect to HPLC, which is an advantage from the analytical point of view. Additionally, the possibility of increasing the flow rate permits the use of SFC for preparative applications,¹²⁵ with the latter one being of major interest to SFC enantioseparations at present.^{126,127}

In addition to the stated characteristics, SFC does not require particular chromatographic supports. On the contrary, most CSPs, particularly those used in normal-phase conditions, can be used indistinctively in HPLC and SFC,¹²⁸ with the only constraint being the need to have available the appropriate equipment. With respect to the chromatographic performance of such CSPs, although analysis time use is shorter and efficacy is higher, there are not remarkable/predictable changes in enantioselectivity for CSPs used with conventional liquids or supercritical fluids as a mobile phase.¹²⁹

54.6. PREPARATIVE ENANTIOSEPARATIONS

The purity requirements demanded in the production of fine chemicals for the manufacture of active pharmaceutical ingredients (APIs) have led to a renewed and widespread interest in preparative chromatography.¹³⁰ The theoretical understanding of the main factors controlling the process and, therefore the possibility to predict its outcome, has promoted a change in the industrial mentality from the previous reticence.

After the wide realization of the cost effectiveness of this purification approach, chromatography has recently become the preferred method for rapidly accessing products of high added value, such as enantiomers.^{7,131} In a drug discovery and development context, enantioselective chromatography is applicable both in the early stages of development of a drug, when the two enantiomers are required, and as the final purification step of synthetic enantioselective processes.

To carry out a direct preparative chromatographic resolution of enantiomers using a conventional single-column system, particular modalities are applied. These contribute to reduce costs and increase productivity, while saving solvent and making full use of the stationary phase. Thus, injections are sometimes performed repeatedly (*multiple close injections*) in such a way that most of the support is involved in the separation at any time during the process. When resolution between peaks is low, it can be improved by *recycling* the overlapped peaks. This is often combined with the so-called *peak-shaving*, which allows for the

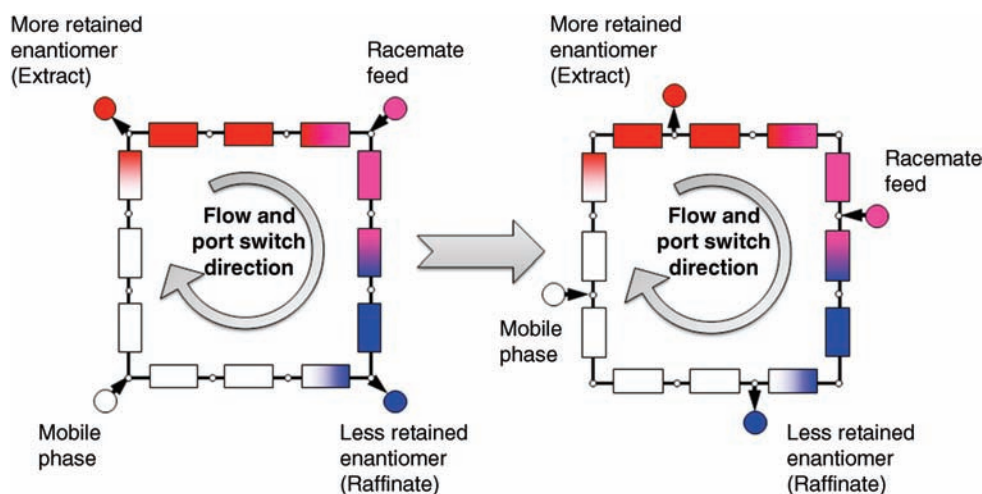


FIGURE 54.16. Schematic diagram of the functionality of a SMB system. Columns are connected head to tail with intercalating valves. There are two inlet streams, feed and eluent, and two outlet streams, the extract and raffinate. After a certain time, the positions of inlets and outlets move, thereby simulating the movement of the stationary phase.

recovery of pure enantiomers at the beginning and the end of a run in which peaks are partially overlapped.

Nevertheless, although other single-column techniques, such as *closed-loop recycling*,^{132,133} have been developed to increase productivity, the multicolumn simulated moving bed (SMB) is by far the most used technology for preparative purposes. SMB can be applied for the purification of several grams of product and up to a multi-ton production demand. At present, several chiral drug compounds are obtained enantiomerically pure thanks to the incorporation of one step of SMB enantioseparation in their production process. This is the case for levetiracetam (UCB, Smyrna, GA), sertraline (Pfizer, New York, NY), or escitalopram (H. Lundbeck, Denmark), among others.⁷

SMB is a method that permits a continuous operation. The fundamental setup consists of a series of chromatographic columns connected head to tail. Between columns, adequate valves allow for modifying the point at which the racemate is introduced into the system as well as that for the introduction of the mobile phase and the position for the recovery of the two enantiomers (Figure 54.16). In contrast to conventional liquid chromatography, a batch technique that is not optimal for production, SMB is a continuous operation technique (Figure 54.17).¹³⁴

Although not all existing analytical CSPs on the market are adequate to up-scale separations, the number of chiral supports available “in bulk” to be used in preparative operations is substantial. Properties such as high loading capacity, chemical stability, and broad mobile phase choice are desirable for CSPs for preparative liquid chromatographic separations. Four types of chiral sorbents are the most widely used.

Once the problem of immobilization has been solved, polysaccharide-derived CSPs (Figure 54.4) are probably the best adapted materials because of their loadability and broad application domain. Also, polymeric CSPs (Figure 54.10), such as polyacrylamides **17–19** and polytartardiamides **20, 21** have an interesting high loadability. Nevertheless, on certain occasions, this property is sacrificed while gaining in stability. This is the case for brush-type stationary phases (Figure 54.8) in which chemical durability and



FIGURE 54.17. SMB-system at Daicel Corporation's Arai plant. The chromatographic system contains eight 30-cm internal-diameter (i.d.) columns (four visible). (Courtesy of Daicel Corporation, Japan.)

strength of the material is their main quality, even if loading is moderate. Also, when looking for particular selectivity or the possibility to be used in a variety of eluting conditions, macrocyclic antibiotic-derived materials (Figure 54.6) are of choice.

One of the main issues to consider when undertaking a preparative separation is the fact that the desired product will be collected as a diluted solution in a solvent that will have to be removed. When possible, the choice of chromatographic mode is influenced by this condition. Thus, considering the volatility of organic solvents and therefore the low energetic demand in removing them, normal-phase conditions are preferred to reversed-phase aqueous eluents. Notwithstanding, polar organic solvents such as methanol or acetonitrile (can) are preferred over more volatile solvents as they can be recovered and reused and are easier to handle safely in important amounts. Also, when imperative for the separation, additives should be volatile. In fact, if additives are only contributing to improve the shape of peaks, and they are not actually necessary for the preparative outcome, it is preferably not to use them. In this aspect, SFC is advantageous over liquid chromatography. Being carbon dioxide, the most important component of the mobile phase, only the added organic modifier has to be evaporated.¹³⁵

Also, the solubility of the analyte is one of the most critical factors when choosing the chromatographic mode to perform a preparative separation. The amount of analyte that could be loaded onto the column and as a consequence the productivity of the whole process will strongly depend on this parameter,¹³⁶ thereby determining the choice of eluting conditions.

54.7. FUTURE TRENDS AND PERSPECTIVES

Chromatography is nowadays a well-established technique in the separation of enantiomers. There are many CSPs that provide separation for almost the totality of possible problems. Nevertheless, research in the field continues in several fronts. One of the most demanding subjects comes from the unpredictability of separations, which imposes a trial-and-error test of CSPs for each new compound. In this context, the search for new CSs continues as does the search for technologies allowing for a significant reduction in the time required to perform these tests.

In this respect, some new CSs have recently appeared in the literature.¹³⁷ It is worth mentioning cyclodextrins, which are similar to cyclodextrins although with a selectivity similar to crown-ethers.¹³⁸ Also new are polyproline selectors.^{139,140} Even if these latter can be considered low MW-CSs, some particularities in the kind of compounds resolved, the conditions in which they show enantioselectivity, and on the loading capacity allow for inferring a

different recognition mechanism than the one acting in brush-type CSPs.¹⁴¹

As for technologies, the so-called ultra-high-pressure liquid chromatography, consisting in the use of submicron particles as chromatographic support, may contribute positively to enantioseparation. This technology provides reduced analysis times at a very low flow rate, thereby decreasing the amount of solvent involved. In this respect, although enantioseparations are possible by introducing the CS as an additive in the mobile phase of the chromatographic system, this approach is not frequently applied. Among others, CS consumption and possible interferences in detection are some of the reasons that account for the low impact of this approach.¹⁴² Nevertheless, this general tendency may change in the near future considering the nano-HPLC systems.¹⁴³ Given the short analysis time and the low flows of mobile phase used, this technology may make affordable the use of a variety of CSs in the mobile phase.

In a completely different approach, considerable research efforts are addressed to enantioselective sensing.^{144,145} There is a strong demand for molecules applicable to the determination of a degree of enantiomeric excess. Such molecules could find an interesting applicability in fields such as the screening of chiral catalysts in enantioselective reactions, or in detecting the addition of a racemic adulterant in food materials. In such situations, the fact of being quick and easy to apply are properties even more significant than the accuracy in the determination of the enantiomeric excess.

As for preparative applications, the choice of technique is closely dependent on the amount of compound to be purified. The use of SFC will continue increasing, in combination with SMB mode or even in single-column mode, given the environmentally friendly character of the technique and the low cost in solvents. SMB, either with liquid or supercritical fluid mobile phases, allows for an improved use of the expensive stationary phase and it is the technique of choice if the purification of important amounts of enantiomers is required. However, one main disadvantage of SMB is the considerable inversion in equipment required, which is only recoverable in a reasonable period of time for companies dealing with a number of analytes or candidates in production.

Among the possible alternatives easily adapted to be run in a continuous mode, countercurrent chromatography (CCC), a liquid-liquid technique, in which the separation of components in a mixture is based on their different partition into two immiscible liquids,^{146,147} can be considered. The implications that the absence of solid support have on the technique makes CCC advantageously suitable for preparative purposes over HPLC. The more remarkable properties of CCC are the high loading capacity and the reduced solvent consumption for a given amount of product

processed.¹⁴⁸ In regard to the separation of enantiomers, the preparative application of CCC can be of great interest given the low cost of this technique compared with conventional liquid chromatography. As for other enantioselective separation techniques, in CCC, a chiral selector is required to produce the enantioselective environment able to separate enantiomers. The CS is preferably added to the liquid stationary phase where it should be confined thanks to its solubility properties. Simultaneously, the racemate has to partition between the two phases of the biphasic solvent system. Encountering a combination of solvent system/CS, adapted to the analyte under study, which fulfill the specified requirements and preserve the enantioselectivity of the CS in the biphasic system, is not an easy task. This is the main reason for the few publications released in this field.¹⁴⁹

54.8. CONCLUSIONS

In recent years, the impact of chirality has been mainly striking in the pharmaceutical field. Its major economic consequences have resulted in large technological advances. At present, the commercial availability of more than 200 types of chiral selectors in combination with highly efficient enantioselective techniques, as liquid chromatography, capillary electrophoresis, or chromatography supercritical fluid, ensures separation of almost all possible chiral compounds. However, the optimization of an appropriate methodology for each separation remains a limiting factor because of the difficulty in predicting CS–analyte interactions.

ACKNOWLEDGMENTS

The financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovacion and from the European Regional Development Fund (ERDF) (CTQ CTQ2010-15203/BQU) is acknowledged. Partial funding from the University of Barcelona is also acknowledged. A. Novell thanks the Generalitat de Catalunya for a doctoral fellowship.

REFERENCES

1. Caldwell J. Through the looking glass in chiral drug development. *Mod. Drug Discov.* 1999;2:51–60.
2. Agranat I, Caner H, Caldwell J. Putting chirality to work: the strategy of chiral switches. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002;1:753–768.
3. Caner H, Gronera E, Levy L, Agranat I. Trends in the development of chiral drugs. *Drug Discovery Today* 2004;9:105–110.
4. Drugs com (Drug information Online): <http://www.drugs.com/top200.html>.
5. *Impurities in new drug substances (Q3A(R2)) and specifications: test procedures and acceptance criteria for new drug substances and new drug products: chemical substances (Q6A)*, International Conference on Harmonisation, <http://www.ich.org>.
6. Maier MN, Lindner L. Stereoselective chromatographic methods for drug analysis. In Francotte E, Lindner W, editors. *Chirality in drug research*. Weinheim: Wiley-VCH; 2006. p 189–260.
7. Francotte E. Isolation and production of optically pure drugs by enantioselective chromatography. In Francotte E, Lindner W, editors. *Chirality in drug research*. Weinheim: Wiley-VCH; 2006. p 155–187.
8. Caccamese S, Chillemi R. Racemization at C-2 of naringin in pummelo (*Citrus grandis*) with increasing maturity determined by chiral high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2010;1217:1089–1093.
9. Yamamoto A, Akiba N, Kodama S, Matsunaga A, Kato K, Nakazawa H. Enantiomeric purity determination of malic acid in apple juices by multi-beam circular dichroism detection. *J. Chromatogr. A* 2001;928:139–144.
10. Ruiz Del Castillo ML, Flores G, Blanch GP, Herraiz M. Effect of thermal treatment during processing of orange juice on the enantiomeric distribution of chiral terpenes. *J. Food Prot.* 2004;67:1214–1219.
11. Polak B. Confirmation of chirality of some natural products by the HPLC method. In Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, editors. *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. Chromatogr. Sci. Ser.* 2011;102:373–396.
12. Ravid U, Elkabetz M, Zamir C, Cohen K, Larkov O, Aly R. Authenticity assessment of natural fruit flavour compounds in foods and beverages by auto-HS-SPME stereoselective GC-MS. *Flavour Fragrance J.* 2010;25:20–27.
13. Braun NA, Meier M, Hammerschmidt F-J. New Caledonian sandalwood oil—a substitute for East Indian sandalwood oil? *J. Essent. Oil Res.* 2005;17:477–480.
14. Xie J, Cheng J, Han H, Sun B, Yanik GW. Resolution of racemic γ -lactone flavors on Chiralpak AD by packed column supercritical fluid chromatography. *Food Chem.* 2010;124:1107–1112.
15. Lu WJ, Ferlito V, Xu C, Flockhart DA, Caccamese S. Enantiomers of naringenin as pleiotropic, stereoselective inhibitors of cytochrome P450 isoforms. *Chirality* 2011;23:891–896.
16. Simo C, Garcia-Canas V, Cifuentes A. Chiral CE-MS. *Electrophoresis* 2010;31:1442–1456.
17. Uray G. Determination of enantiomeric purity via formation of diastereomers. Nuclear magnetic resonance. In Helmchen G, Hoffmann RW, Mulzer J, Schaumann E, editors. *Stereoselective synthesis, series: methods of organic chemistry (Houben-Weyl)*, Volume 21a. Stuttgart (Germany): Thieme; 1995. p 253–292.

18. Bertrand M, Chabin A, Brack A, Westall F. Separation of amino acid enantiomers via chiral derivatization and non-chiral gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 2008;1180:131–137.
19. Lindner W. Determination of enantiomeric purity via formation of diastereomers. Chromatographic methods. In Helmchen G, Hoffmann RW, Mulzer J, Schaumann E, editors. *Stereoselective synthesis, series: methods of organic chemistry (Houben-Weyl)*, Volume 21a. Stuttgart (Germany): Thieme; 1995. p 225–252.
20. Lindner W. Indirect separation of enantiomers by liquid chromatography. *Chromatogr. Sci. Ser.* 1988;40:91–130.
21. Armstrong DW, He L, Yu T, Lee JT, Liu Y. Enantiomeric impurities in chiral catalyst, auxiliaries, synthons and resolving agents, Part 2. *Tetrahedron: Asymm.* 1999;10:37–60.
22. Wenzel TJ. *Discrimination of chiral compounds using NMR spectroscopy*. Hoboken (NJ): Wiley-Interscience; 2007.
23. Lämmerhofer M, Lindner W. Recent developments in liquid chromatographic enantioseparation. In Valkó K, editor. *Separation methods in drug synthesis and purification*. Amsterdam: Elsevier; 2000. p 337–438.
24. Lämmerhofer M. Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* 2010;1217:814–856.
25. Haginaka J. Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparation. *J. Chromatogr. A* 2001;906:253–273.
26. Hermansson J. Enantiomeric separation of drugs and related compounds based on their interaction with α 1-acid glycoprotein. *Trends Anal. Chem.* 1989;8:251–259.
27. Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 2005;353:38–52.
28. Zhou L, Mao B, Ge Z. Comparative study of immobilized α 1 acid glycoprotein and ovomucoid protein stationary phases for the enantiomeric separation of pharmaceutical compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008;46:898–906.
29. Michishita T, Franco P, Zhang T. New approaches of LC-MS compatible method development on α 1-acid glycoprotein-based stationary phase for resolution of enantiomers by HPLC. *J. Sep. Sci.* 2010;33:3627–3637.
30. Zhang T, Nguyen D, Franco P. Reversed-phase screening strategies for liquid chromatography on polysaccharide-derived chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* 2010;1217:1048–1055.
31. Yashima E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *J. Chromatogr. A* 2001;906:105–125.
32. Nelander H, Andersson S, Öhlén K. Evaluation of the chiral recognition properties as well as the column performance of four chiral stationary phases based on cellulose (3,5-dimethylphenylcarbamate) by parallel HPLC and SFC. *J. Chromatogr. A* 2011;1218:937–9405.
33. Franco P, Senso A, Oliveros L, Minguillón C. Covalently bonded polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2001;906:155–170.
34. Zhang T, Nguyen D, Franco P. Enantiomer resolution screening strategy using multiple immobilised polysaccharide-based chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* 2008;1191:214–222.
35. Thunberg L, Hashemi J, Andersson S. Comparative study of coated and immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases and their applicability in the resolution of enantiomers. *J. Chromatogr. B* 2008;875:72–80.
36. Ma S, Shen S, Lee H, Eriksson M, Zeng X, Xu J, Fandrick K, Yee N, Senanayake C, Grinberg N. Mechanistic studies on the chiral recognition of polysaccharide-based chiral stationary phases using liquid chromatography and vibrational circular dichroism. Reversal of elution order of *N*-substituted α -methyl phenylalanine esters. *J. Chromatogr. A* 2009;1216:3784–3793.
37. Ikai T, Okamoto Y. Preparation and chiral recognition of polysaccharide-based selectors. In Berthod A, editor. *Chiral recognition in separation methods*. Heidelberg: Springer; 2010. p 33–52.
38. Yashima E, Yamamoto C, Okamoto Y. NMR studies of chiral discrimination relevant to the liquid chromatographic enantioseparation by a cellulose phenylcarbamate derivative. *J. Am. Chem. Soc.* 1996;118:4036–4048.
39. Kasat RB, Wee SY, Loh JX, Wang N-HL, Franses EI. Effect of the solute molecular structure on its enantioresolution on cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate). *J. Chromatogr. B* 2008;875:81–92.
40. O'Brien T, Crocker L, Thompson R, Thompson K, Toma PH, Conlon DA, Feibush B, Moeder C, Bicker G, Grinberg N. Mechanistic aspects of chiral discrimination on modified cellulose. *Anal. Chem.* 1997;69:1999–2007.
41. Francotte E, Zhang T. Supramolecular effects in the chiral discrimination of meta-methylbenzoyl cellulose in high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1995;718:257–266.
42. Chankvetadze B. Combined approach using capillary electrophoresis and NMR spectroscopy for an understanding of enantioselective recognition mechanisms by cyclodextrins. *Chem. Soc. Rev.* 2004;33:337–347.
43. Armstrong DW, Tang Y, Ward T, Nichols M. Derivatized cyclodextrins immobilized on fused-silica capillaries for enantiomeric separations via capillary electrophoresis, gas chromatography, or supercritical fluid chromatography. *Anal. Chem.* 1993;65:1114–1117.
44. Chankvetadze B. *Capillary electrophoresis in chiral analysis*. Chichester (U.K.): Wiley; 1997.
45. Schneiderman E, Stalcup AM. Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *J. Chromatogr. B* 2000;745:83–102.
46. Mitchell CR, Armstrong DW. Cyclodextrin-based chiral stationary phases for liquid chromatography a twenty-year overview. In Gübitz G, Schmid MG, editors. *Chiral Separations*. Totowa (NJ): Humana Press; 2004. p 61–112.
47. Armstrong DW, Tang Y, Chem S, Zhou Y, Bagwill C, Chen J-R. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors

- for liquid chromatography. *Anal. Chem.* 1994;66: 1473–1484.
48. Xiao TL, Rozhkov RV, Larock RC, Armstrong DW. Separation of the enantiomers of substituted dihydrofurocoumarins by HPLC using macrocyclic glycopeptide chiral stationary phases. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003;377:639–654.
 49. Ilisz I, Berkecz R, Péter A. Retention mechanism of high-performance liquid chromatographic enantioseparation on macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* 2009;1216:1845–1860.
 50. Cram DJ, Cram JM. Design of complexes between synthetic hosts and organic guests'. *Acc. Chem. Res.* 1978;11:8–14.
 51. Hyun MH. Enantiomer separation by crown ether stationary phases. In: Subramanian G, editor. *Chiral separation techniques. A practical approach*, 3rd edition. Weinheim: Wiley-VCH 2007. p 275–299.
 52. Pirkle WH, Welch CJ. Chromatographic and ^1H NMR support for a proposed chiral recognition model. *J. Chromatogr. A* 1994;683:347–353.
 53. Czerwenka C, Zhang MM, Kählig H, Maier NM, Lipkowitz KB, Lindner W. Chiral recognition of peptide enantiomers by cinchona alkaloid derived chiral selectors: mechanistic investigations by liquid chromatography, NMR spectroscopy, and molecular modeling. *J. Org. Chem.* 2003;68: 8315–8327.
 54. Davankov VA. 30 Years of chiral ligand exchange. *Enantiomer* 2000;5:209–223.
 55. Tang L, Xiang D, Blackwell, JA. A comparative study of factors affecting chiral separations under reversed-phase conditions using cellulosic and Pirkle-type chiral selectors. *Enantiomer* 2000;5:345–355.
 56. Welch CJ, Szczerba T, Perrin SR. Some recent high-performance liquid chromatography separations of the enantiomers of pharmaceuticals and other compounds using the Whelk-O1 chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A* 1997;758:93–98.
 57. Maier NM, Schefzick S, Lombardo GM, Feliz M, Rissanen K, Lindner W, Lipkowitz KB. Elucidation of the chiral recognition mechanism of cinchona alkaloid carbamate-type receptors for 3,5-dinitrobenzoyl amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* 2002;124:8611–8629.
 58. Reischl RJ, Hartmanova L, Carrozzo M, Huszar M, Fruehauf P, Lindner W. Chemoselective and enantioselective analysis of proteinogenic amino acids utilizing *N*-derivatization and 1-D enantioselective anion-exchange chromatography in combination with tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 2011;1218:8379–8387.
 59. Dabre R, Azad N, Schwaemmle A, Laemmerhofer M, Lindner W. Simultaneous separation and analysis of water- and fat-soluble vitamins on multi-modal reversed-phase weak anion exchange material by HPLC-UV. *J. Sep. Sci.* 2011;34: 761–772.
 60. Davankov VA. Enantioselective ligand exchange in modern separation techniques. *J. Chromatogr. A* 2003;1000: 891–915.
 61. Kurganov A. Chiral chromatographic separations based on ligand exchange. *J. Chromatogr. A* 2001;906:51–71.
 62. Blaschke G, Broecker W, Fraenkel W. Enantiomeric resolution by HPLC on silica-gel-bound, optically active polyamides. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1986;25:830–831.
 63. Kinkel JN, Optically active polyacrylamide/silica composites and related packings and their application in chiral separations. In Subramanian G, editor. *A practical approach to chiral separation techniques*. (1st edition) Weinheim: Wiley-VCH; 1994. p 217–277.
 64. Andersson S, Allenmark S, Moeller P, Persson B, Sanchez D. Chromatographic separation of enantiomers on *N*, *N'*-diallyl-L-tartardiamide-based network-polymeric chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* 1996;741:23–31.
 65. Okamoto Y. (–)-Sparteine: the compound that most significantly influenced my research. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2004;42:4480–4491.
 66. Armstrong DW, Zhang B. Chiral stationary phases for HPLC. Choosing the right stationary phase can be daunting. *Anal. Chem.* 2001;73:557A–561A.
 67. Mangelings D, Vander Heyden Y. Screening approaches for chiral separations. In Grinberg N, Grushka E, editors. *Advances in chromatography*, 2007;46:175–211.
 68. Akin A, Antosz FJ, Ausec JL, Greve KF, Johnson RL, Magnusson L-E, Ramstad T, Secrest SL, Seibert DS, Webster GK. An orthogonal approach to chiral method development screening. *Curr. Pharm. Anal.* 2007;3:53–70.
 69. Sajonz P, Gong X, Leonard Jr.WR, Biba M, Welch CJ. Multiparallel chiral method development screening using an 8-channel microfluidic HPLC system. *Chirality* 2006;18: 803–813.
 70. Sajonz P, Schafer W, Gong X, Shultz S, Rosner T, Welch CJ. Multiparallel microfluidic high-performance liquid chromatography for high-throughput normal-phase chiral analysis. *J. Chromatogr. A* 2007;1145:149–154.
 71. Roussel C, Bonnet B, De Riggi I, Suteu C. Simultaneous microbatch screening of enantioselective recognition on solid chiral selectors using selected mixtures of test-racemates: a case study on cellulose tris(α -phenylpropionate) with configurational diversity. *Biomed. Chromatogr.* 2001;15:173–180.
 72. Chen Z, Ynag Y, Werner S, Wipf P, Weber SG. A screening method for chiral selectors that does not require covalent attachment. *J. Am. Chem. Soc.* 2006;128:2208–2209.
 73. Roussel C, Rafii E, Del Rio A, Vanthuyne N. Enantioselective recognition on solid chiral selectors using microbatch technology: an example of limitation in case of strong association in the racemate. *Biomed. Chromatogr.* 2005;19:434–438.
 74. ChirBase: <http://chirbase.u-3mrs.fr> (distributed by ACDLabs: <http://www.acdlabs.com/products/adh/chrom/chirbase>).
 75. Roussel C, Pierrot-Sanders J, Heitmann I, Piras P. CHIRBASE: database current status and derived research applications using molecular similarity, decision tree and 3D “enantiophore” search. In Subramanian G, editor. *Chiral Separation Techniques. A practical Approach*. 2nd edition. Weinheim: Wiley-VCH; 2001. p 95–125.

76. de la Puente ML, White CT, Rivera-Sagredo A, Reilly J, Burton K, Harvey G. Impact of normal-phase gradient elution in chiral chromatography: a novel, robust, efficient and rapid chiral screening procedure. *J Chromatogr. A* 2003;983:101–114.
77. Matthijs N, Perrin C, Maftouh M, Massart DL, Vander Heyden Y. Definition and system implementation of strategies for method development of chiral separations in normal or reversed-phase liquid chromatography using polysaccharide-based stationary phases. *J. Chromatogr. A* 2004;1041: 119–133.
78. Wallworth DM, Beesley TE, Armstrong DW. Method development techniques on a new multimodal chiral liquid chromatographic column. *Anal. Proceedings* 1992;29: 247–249.
79. Armstrong DW, Tang Y, Chen S, Zhou Y, Bagwill C, Chen J-R. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. *Anal. Chem.* 1994;66: 1473–1484.
80. Xiao TL, Zhang B, Lee JT, Hui F, Armstrong DW. Reversal of enantiomeric elution order on macrocyclic glycopeptide chiral stationary phases. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* 2001;24:2673–2684.
81. Bakhtiar R, Tse FLS. High-throughput chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000;14:1128–1135.
82. Franco P, Zhang T. Common approaches for efficient method development with immobilised polysaccharide-derived chiral stationary phases. *J. Chromatogr. B* 2008;875:48–56.
83. Mitchell CR, Armstrong DW. Cyclodextrin-based chiral stationary phases for liquid chromatography. *Chiral Separations. Methods Mol. Biol.* 2004;243:61–112.
84. Beesley TE, Lee JT. Method development and optimization of enantioseparations using macrocyclic glycopeptide chiral stationary phases. In Subramanian G, editor. *Chiral separation Techniques. A practical Approach*. 3rd edition. Weinheim: Wiley-VCH; 2007. p 1–28.
85. Rekharsky MV, Inoue Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. *Chem. Rev.* 1998;98:1875–1917.
86. Aranyi A, Ilisz I, Pataj Z, Szatmári I, Fülöp F, Péter A. High-performance liquid chromatographic enantioseparation of 1-(phenylethylamino)- or 1-(naphthylethylamino)methyl-2-naphthol analogs and a temperature-induced inversion of the elution sequence on polysaccharide-based chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A* 2011;1218:4869–4876.
87. Schurig V, Betschinger F. Metal-mediated enantioselective access to unfunctionalized aliphatic oxiranes: prochiral and chiral recognition. *Chem. Rev.* 1992;92:873–888.
88. Levkin PA, Levkina A, Czesla H, Schurig V. Temperature-induced inversion of the elution order of enantiomers in gas chromatography: *N*-ethoxycarbonylpropylamides and *N*-trifluoroacetyl ethyl esters of α -amino acids on Chirasil-Val-C11 and Chirasil-Dex stationary phases. *Anal. Chem.* 2007;79:4401–4409.
89. Stringham RW, Blackwell JA. “Entropically driven” chiral separations in supercritical fluid chromatography. Confirmation of isoelution temperature and reversal of elution order. *Anal. Chem.* 1996;68:2179–2185.
90. Schlauch M, Frahm AW. A thermodynamic study of the temperature-dependent elution order of cyclic α -amino acids on a copper (II)-D-penicillamine chiral stationary phase. *Anal. Chem.* 2001;73:262–266.
91. Yao B, Zhan F, Yu G, Chen Z, Fan W, Zeng X, Zeng Q, Weng W. Temperature-induced inversion of elution order in the chromatographic enantioseparation of 1,1'-bi-2-naphthol on an immobilized polysaccharide-based chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A* 2009;1216:5429–5435.
92. Cirilli R, Ferretti R, Gallinella B, Zanitti L, La Torre F. A new application of stopped-flow chiral HPLC: inversion of enantiomer elution order. *J. Chromatogr. A* 2004;1061: 27–34.
93. D'Acquarica I, Gasparrini F, Pierini M, Villani C, Zappia G. Dynamic HPLC on chiral stationary phases: a powerful tool for the investigation of stereomutation processes. *J Sep Sci* 2006;29:1508–1516.
94. Krupcik J, Oswald P, Majek P, Sandra P, Armstrong DW. Determination of the interconversion energy barrier of enantiomers by separation methods. *J Chromatogr A* 2003;1000: 779–800.
95. Trapp O. Fast and precise access to enantiomerization rate constants in dynamic chromatography. *Chirality* 2006;18: 489–497.
96. Trapp O, Trapp G, Schurig V. Direct calculation and computer simulation of the enantiomerization barrier of oxazepam in dynamic HPLC experiments—a comparative study. *J. Biochem. Bioph. Methods* 2002;54:301–313.
97. Jenkins AL, Hedgepeth WA. Analysis of chiral pharmaceuticals using HPLC with CD detection. *Chirality* 2005;17: S24–S29.
98. Kott L, Holzheuer WB, Wong MM, Webster GK. An evaluation of four commercial HPLC chiral detectors: a comparison of three polarimeters and a circular dichroism detector. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007;43:57–65.
99. Roussel C, Vanthuyne N, Serradeil-Albalat M, Vallejos J-C. True or apparent reversal of elution order during chiral high-performance liquid chromatography monitored by a polarimetric detector under different mobile phase conditions. *J. Chromatogr. A* 2003;995:79–85.
100. Ghanem A. True and false reversal of the elution order of barbiturates on a bonded cellulose-based chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A* 2006;1132:329–332.
101. Ward TJ, Baker BA. Chiral separations. *Anal. Chem.* 2008; 80:4363–4372.
102. Ward TJ, Ward KD. Chiral separations: fundamental review 2010. *Anal. Chem.* 2010;82:4712–4722.
103. Ward TJ, Ward KD. Chiral separations: a review of current topics and trends. *Anal. Chem.* 2012;84:626–635.
104. Schurig V. Separation of enantiomers by gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 2001;906:275–299.
105. Juza M, Jakubetz H, Hettesheimer H, Schurig V. Quantitative determination of isoflurane enantiomers in blood samples

- during and after surgery *via* headspace gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 1999;735:93–102.
106. Schurig V, Juza M. Approach to the thermodynamics of enantiomer separation by gas chromatography. Enantioselectivity between the chiral inhalation anesthetics enflurane, isoflurane and desflurane and a diluted γ -cyclodextrin derivative. *J. Chromatogr. A* 1997;757:119–135.
 107. Liu Y-J, Hall D, Cross J, Farman D, Amarawardana L, Liu Q-R, He X-K. (2S,8Z)-2-butyroxy-8-heptadecene: major component of the sex pheromone of chrysanthemum gall midge, *Rhopalomyia longicauda*. *J. Chem. Ecol.* 2009;35:715–723.
 108. Chow S, Koenig WA, Kitching W. Synthesis and enantioselective gas chromatography of stereoisomers of 7,11-dimethylheptadecane—a pheromone component of *Lambdina* species. *Eur. J. Org. Chem.* 2004: 1198–1201.
 109. Lorenzo D, Paz D, Davies P, Villamil J, Vila R, Cañigüeral S, Dellacassa E. Application of multidimensional gas chromatography to the enantioselective characterisation of the essential oil of *Eupatorium buniifolium* Hooker et Arnott. *Phytochem. Anal.* 2005;16:39–44.
 110. Shellie R, Marriott P, Cornwell C. Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC \times GC) to the enantioselective analysis of essential oils. *J. Sep. Sci.* 2001;24:823–830.
 111. König WA, Hochmuth DH. Enantioselective gas chromatography in flavor and fragrance analysis: strategies for the identification of known and unknown plant volatiles. *J. Chromatogr. Sci.* 2004;42:423–439.
 112. Meierhenrich U, Thiemann WH-P, Rosenbauer H. Pyrolytic methylation assisted enantioseparation of chiral hydroxycarboxylic acids. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 2001;60:13–26.
 113. Hauff S, Rilfors L, Hottinger G, Vetter W. Structure and absolute configuration of an unsaturated anteiso fatty acid from *Bacillus megaterium*. *J. Chromatogr. A* 2010;1217:1683–1687.
 114. Thurnhofer S, Hottinger G, Vetter W. Enantioselective determination of anteiso fatty acids in food samples. *Anal. Chem.* 2007;79:4696–4701.
 115. Terabe S, Otsuka K, Ichikawa K, Tsuchiya A, Ando T. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal. Chem.* 1984;56:111–113.
 116. Li S, Lloyd DK. Direct chiral separations by capillary electrophoresis using capillaries packed with an α -acid glycoprotein chiral stationary phase. *Anal. Chem.* 1993;65:3684–3690.
 117. Gassmann E, Kuo JE, Zare RN. Electrokinetic separation of chiral compounds. *Science* 1985;230:813–814.
 118. Vespalec R, Bocek P. Chiral separations in capillary electrophoresis. *Chem. Rev.* 2000;100:3715–3753.
 119. Scriba GKE. Cyclodextrins in capillary electrophoresis enantioseparations—recent developments and applications. *J. Sep. Sci.* 2008;31:1991–2011.
 120. Juvancz Z, Bodáné Kendrovics R, Iványi R, Szenté L. The role of cyclodextrins in chiral capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2008;29:1701–1712.
 121. Fanali S, Aturki Z, D’Orazio G, Rocco A. Macrocyclic antibiotics as chiral selectors. *Chromatogr. Sci. Ser.* 2010;100:109–137.
 122. Wang Z, Tang Z, Gu Z, Hu Z, Ma S, Kang J. Enantioseparation of chiral allenic acids by micellar electrokinetic chromatography with cyclodextrins as chiral selector. *Electrophoresis* 2005;26:1001–1006.
 123. Terabe S, Shibata M, Miyashita Y. Chiral separation by electrokinetic chromatography with bile salt micelles. *J. Chromatogr.* 1989;480:403–411.
 124. De Klerck K, Mangelings D, Clicq D, De Boever F, Vander Heyden Y. Combined use of isopropylamine and trifluoroacetic acid in methanol-containing mobile phases for chiral supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2012;1234:72–79.
 125. Miller L, Potter M. Preparative chromatographic resolution of racemates using HPLC and SFC in a pharmaceutical discovery environment. *J. Chromatogr. B* 2008;875:230–236.
 126. Terfloth G. Enantioseparations in super and subcritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2001;906:301–307.
 127. De Klerck K, Mangelings D, Vander Heyden Y. Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012;69:77–92.
 128. Nelander H, Andersson S, Öhlén K. Evaluation of the chiral recognition properties as well as the column performance of four chiral stationary phases based on cellulose (3,5-dimethylphenylcarbamate) by parallel HPLC and SFC. *J. Chromatogr. A* 2011;1218:9397–9405.
 129. Felix G, Berthod A, Piras P, Roussel C. Commercial chiral stationary phases for the separations of clinical racemic drugs part iii: supercritical fluid chromatographic Separations. *Sep. Pur. Rev.* 2008;37:229–301.
 130. Franco P, Minguillón C. Techniques in Preparative Chiral Separations. In Subramanian G, editor. *Chiral separations techniques. A practical approach*. Weinheim: Wiley-VCH 2001. p 1–23.
 131. Andersson S. preparative chiral chromatography a powerful and efficient tool in drug discovery. In Subramanian G, editor. *Chiral separation techniques*. Weinheim: Wiley-VCH 2007. p 585–600.
 132. Crawford M E, Stevens J M, Roenneburg L, Yanik G. Optimization of steady state recycling parameters utilizing polarimetry in chiral separations. *J. Chromatogr. A* 2008;1178:56–59.
 133. Kazi M-K, Medi B, Amanullah M. Optimization of an improved single-column chromatographic process for the separation of enantiomers. *J. Chromatogr. A* 2012;1231:22–30.
 134. Juza M, Mazzotti M, Morbidelli M. Simulated moving-bed chromatography and its application to chirotechnology. *Trends Biotechnol.* 2000;18:108–118.
 135. Miller L. Preparative supercritical fluid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2012;1250:250–255.
 136. Zhang T, Schaeffer M, Franco P. Optimization of the chiral separation of a Ca-sensitizing drug on an immobilized

- polysaccharide-based chiral stationary phase Case study with a preparative perspective. *J. Chromatogr. A* 2005;1083: 96–101.
137. Cavazzini A, Pasti L, Massi A, Marchetti N, Dondi F. Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: a review. *Anal. Chim. Acta* 2011;706:205–222.
 138. Armstrong DW, Sun P. Effective enantiomeric separations of racemic primary amines by the isopropyl carbamate–cyclofructan6 chiral stationary phase. *J. Chromatogr. A* 2010;1217:4904–4918.
 139. Huang J, Zhang P, Chen H, Li T. Preparation and evaluation of proline-based chiral columns. *Anal. Chem.* 2005;77: 3301–3308.
 140. Sancho R, Pérez AM, Minguillón C. A (4*R*)-hydroxy-L-proline-derived chiral scaffold and its oligomers as chiral selectors in liquid chromatography chiral stationary phases for enantioseparation. *J. Sep. Sci.* 2006;29:905–914.
 141. Sancho R, Minguillón C. Polyproline derivatives as chiral selectors in high performance liquid chromatography: chromatographic and conformational studies. *J. Chromatogr. B* 2008;875:93–101.
 142. Pettersson C, Heldin E. Ion-pair chromatography in enantiomer separations. In Subramanian G, editor. *A practical approach to chiral separations by liquid chromatography*. Weinheim: Wiley-VCH; 1994. p 279–310.
 143. Rosales-Conrado N, Leon-Gonzalez ME, Rocco A, Fanali S. Enantiomeric separation of ofloxacin by nano-liquid chromatography using a sulfated- β -cyclodextrin as a chiral selector in the mobile phase. *Current Anal. Chem.* 2010;6: 209–216.
 144. Leung D, Ok Kang S, Anslyn EV. Rapid determination of enantiomeric excess: a focus on optical approaches. *Chem. Soc. Rev.* 2012;41:448–479.
 145. Pu L. Fluorescence of organic molecules in chiral recognition. *Chem. Rev.* 2004;104:1687–1716.
 146. Berthod A, editor. Countercurrent chromatography, the support-free liquid stationary phase. Volume 38, *Comprehensive analytical chemistry*. Amsterdam: Elsevier Science; 2002.
 147. Minguillón C. Countercurrent chromatography, scope and perspectives: application to chirotechnology. *Chem. Eng. Technol.* 2012;35:35–45.
 148. Rubio N, Minguillón C. Preparative enantioseparation of (\pm)-*N*-(3,4-*cis*-3-decyl-1,2,3,4-tetrahydrophenanthren-4-yl)-3,5-dinitrobenzamide by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 2010;1217:1183–1190.
 149. Rubio N, Minguillón C. Enantioselective recognition in solution: the case of countercurrent chromatography. In: Berthod A, editor. *Chiral recognition in separation methods mechanisms and applications*. Heidelberg: Springer-Verlag; 2010. p 241–274.

OBJECTIUS

Objectius

En el terreny de la cromatografia enantioselectiva, el disseny i desenvolupament de nous selectors quirals (SQs) i/o fases estacionàries quirals (FEQs) amb un ampli espectre d'aplicació o amb una enantioselectivitat determinada ha esdevingut un gran repte durant els últims 35 anys [101,102]. Els resultats dels estudis realitzats mitjançant tècniques espectroscòpiques o cristal·logràfiques per tal d'entendre i confirmar les interaccions que es produeixen entre el SQ i l'analit s'han utilitzat en el disseny de FEQs [67,70,103,104]. També s'han emprat altres estratègies com la química combinatòria per tal de contribuir a la identificació d'esquelets bàsics en certes famílies de compostos que presentin uns valors d'enantioselectivitat més elevats [105–108]. No obstant, sovint els avenços més significatius aconseguits han estat basats en la intuïció química i en el tradicional mètode de prova i error.

Així doncs, en la present tesi doctoral, es pretén dissenyar, desenvolupar i caracteritzar SQs de tipus oligoprolina i les corresponents FEQs, així com estudiar el seu comportament en diferents condicions cromatogràfiques. Les característiques específiques de l'aminoàcid L-prolina quan s'agrupa formant cadenes, extensament comentades en la introducció, i l'èxit de l'ús de l'aminoàcid prolina en altres tècniques cromatogràfiques [109–112] van fer que l'esquelet d'oligoprolina es seleccionés com a nucli de partida. A més a més, l'experiència prèvia del grup en FEQs que contenen oligòmers de prolina derivatitzats [87,91] per a la seva posterior aplicació a la cromatografia líquida enantioselectiva i els resultats particulars obtinguts amb alguns d'ells han conduït el nostre treball a aprofundir en aquesta direcció.

Conseqüentment, en la present tesis doctoral ens proposem estudiar el fenomen de l'enantioselectivitat exercit per les FEQs amb un SQ de tipus oligoprolina en sistemes cromatogràfics diversos. Per tal d'incrementar les possibilitats d'enantioselecció, s'han identificat tres elements que hi juguen un paper clau.

- i) En primer lloc, *l'estructura del SQ* és un element essencial, ja que aquesta ha d'interaccionar en certa manera amb el compost racèmic que es vol separar i ha de permetre l'associació diferencial amb cadascun dels enantiòmers d'aquest darrer.
- ii) També, *la fase mòbil* utilitzada condiona l'entorn en el que es dona el reconeixement, i aquesta pot actuar facilitant o dificultant l'associació necessària entre el SQ i cada un dels dos enantiòmers per a que es produeixi enantioselectivitat. A més a més, com s'ha comentat en la introducció, és conegut que les estructures de tipus poliprolina poden

canviar de conformació segons el dissolvent en la qual es troben immerses. Per consegüent, la capacitat enantioselectiva pot resultar sensible al medi en el que es produeix la interacció entre el SQ i cada un dels enantiòmers.

- iii) Finalment, *la naturalesa de la matriu cromatogràfica* de la qual està constituïda la FEQ determina la quantitat de SQ que s'hi pot enllaçar, així com les propietats hidrodinàmiques de la fase mòbil que circula a través seu. És a dir, el suport cromatogràfic pot facilitar la disponibilitat i accessibilitat del SQ necessaris per tal que es produeixi l'enantioselectió, afavorint així un major grau de separació.

D'aquesta manera, amb la finalitat de poder aconseguir FEQs aplicables a la separació d'un ampli rang d'enantiòmers, i un cop identificats els punts crítics en els quals podem actuar i intentant millorar els resultats previs obtinguts en el nostre grup amb els derivats de la 4-hidroxiprolina, en la present tesi doctoral ens varem plantejar els següents objectius:

- 1) Per tal d'aprofitar les propietats intrínseques de l'aminoàcid L-prolina, àmpliament descrites en la introducció, considerem el disseny i síntesi d'un SQ derivat de l'oligoprolina sense cap substituent. Una estructura més simple que ens haurà de servir per veure si les propietats presentades per les oligoprolines substituïdes estudiades prèviament (més capacitat de càrrega que el SQs monomèrics i diferent comportament enantioselectiu segons la fase mòbil emprada [veure introducció p. 36-39]) són generalitzables.

D'aquesta manera, un cop demostrat que l'ús d'estructures polimèriques de la L-prolina substituïda en la posició 4 resultava en una major enantioselectivitat, un millor comportament cromatogràfic i una més gran capacitat de càrrega que les respectives FEQs monomèriques [87,91] i tenint en compte els resultats i observacions de Li i col·laboradors [75-77], considerem com a SQ una cadena d'oligoprolina no substituïda d'una llargada de 8 unitats de L-prolina i rematada per un grup pivaloïl (Figura 3.1).

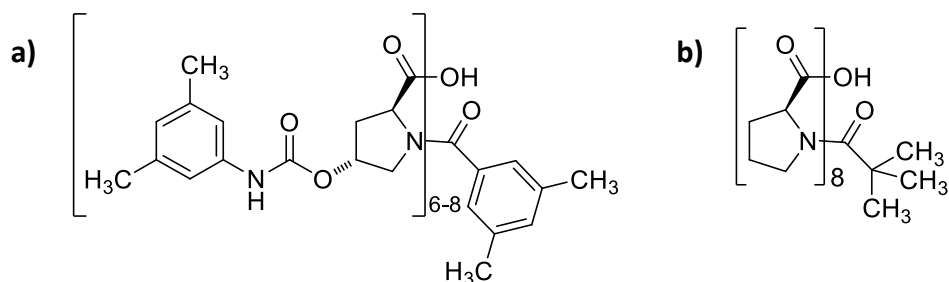


Figura 3.1. Selectors quirals derivats de l'oligoprolina. a) SQ derivat de la 4-hidroxiprolina. b) Nou selector quiral format per vuit monòmers de L-prolina.

En aquest context, ens plantegem la preparació d'una FEQ constituïda per un SQ format per vuit unitats de prolina. La síntesi de l'octapèptid es dur a terme mitjançant un mètode de síntesi peptídica en fase sòlida (SPPS). Aquesta aproximació és significativament més ràpida, més econòmica i menys tediosa, ja que es tracta d'una SPPS tipus Fmoc utilitzant una resina de poliestirè de 2-clorotritil (Figura 3.2), evitant així la feixuga síntesi d'un espaiador (pàg. 35 Introducció) complicat de preparar. Tot això i el fet que part del procés pot ser escalat i automatitzat, resulta en un procediment més eficient i econòmicament més rendible.

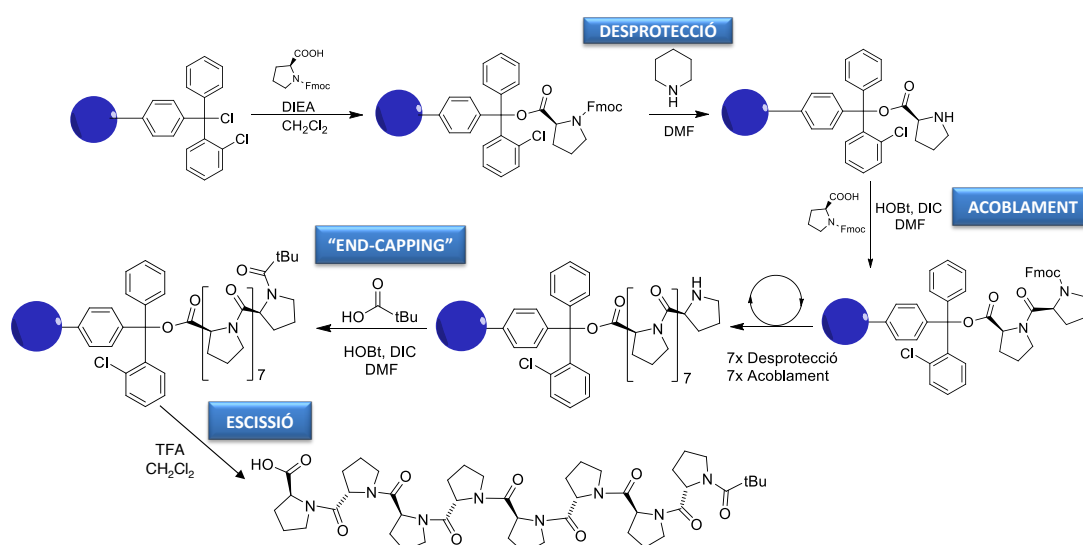


Figura 3.2. Esquema de la síntesi peptídica en fase sòlida tipus Fmoc emprada per sintetitzar el SQ derivat de l'octaprolina.

Tota la síntesi es durà a terme en la resina, de la qual s'escindirà el SQ que posteriorment s'ha de fixar sobre la matriu cromatogràfica. Això permet la caracterització de l'entitat química mitjançant MS/MALDI-TOF. Finalment, ens proposem enllaçar covalentment el pèptid a diferents matrius cromatogràfiques mitjançant un grup espaiador aminopropil, prèviament unit a la sílice, que proporciona la distància necessària entre el SQ i la matriu. S'avaluarà la idoneïtat de les diferents FEQs obtingudes a partir d'aquest SQ.

- 2) Així doncs, les propietats cromatogràfiques d'aquest nou SQ s'examinaran utilitzant un ventall d'analits racèmics i es realitzarà un estudi comparatiu amb FEQs estudiades prèviament [87,91]. Finalment, atesa la diversitat estructural dels analits racèmics testats, la diferent habilitat enantioselectiva segons el dissolvent ens plantegem poder esbrinar indicacions sobre com pot produir-se l'enantioreconeixement en les FEQs estudiades.

- 3) També ens proposem estudiar la influència del tipus de fase mòbil en l'estructura i la conformació d'aquest nou SQ, i com els canvis en aquestes propietats poden afectar l'enantioselectivitat i el comportament cromatogràfic.

Els treballs anteriors duts a terme per la Sra. Raquel Sancho [87,91] ja havien demostrat que les FEQs derivades de la poliprolina tenien un comportament particular segons el dissolvent que s'utilitzés en la fase mòbil. Així doncs, l'enantioselectivitat desapareixia d'una manera reversible quan s'utilitzaven fases mòbils habituals en cromatografia quiral com poden ser els dissolvents clorats mesclats amb solvents apròtics com els alcans. Aquesta dependència de l'enantioselectivitat en la fase mòbil hauria de ser atribuïble al canvi de conformació de les cadenes de prolina en canviar de dissolvent. Conseqüentment, en la present tesi doctoral es pretén profunditzar en aquest fenomen i la seva reversibilitat.

- 4) Estudiar la influència de la matriu cromatogràfica en el comportament cromatogràfic de les FEQs.

Fins al moment, l'ús de columnes farcides de partícules de sílice havia estat la regla general en la recerca del nostre grup. La modificació covalent de noves fases estacionàries formades per monòlits hauria d'obrir les portes tant a la millora dels paràmetres cromatogràfics de les FEQs com a l'ús d'aquestes en cromatografia quiral preparativa.

Així doncs, en la present tesi doctoral es considerarà la preparació de FEQs monolítiques i s'examinarà el comportament cromatogràfic d'aquestes columnes, en termes d'enantioselectivitat, resolució, eficiència i capacitat de càrrega.

- 5) Avaluar la compatibilitat de les FEQs derivades de la poliprolina quan s'empren condicions de cromatografia de fluids supercrítics.

D'entre les distintes tècniques de separació basades en la utilització de sistemes líquid-sòlid, el nostre estudi s'ha centrat principalment en la cromatografia de líquids d'alta eficàcia (HPLC). No obstant, la cromatografia de fluids supercrítics (SFC) desperta un enorme interès tan a nivell analític com preparatiu. Per tant, ens proposem estudiar l'aplicació de condicions de cromatografia supercrítica sobre de les diferents FEQs preparades. Els valors cromatogràfics com l'enantioselectivitat, l'eficiència i la resolució, així com l'estudi del temps d'anàlisi, seran objecte del nostre interès.

Així doncs, l'objectiu global d'aquesta tesi doctoral és contribuir a l'estudi de l'aplicabilitat de fases estacionàries quirals de la família de les oligoprolines en cromatografia líquida convencional i cromatografia de fluids supercrítics per a la separació d'un ampli rang de mescles racèmiques, considerant-ne sempre els avantatges i els inconvenients.

RECERCA EXPERIMENTAL I RESULTATS

4.1. L'octaprolina, un selector quiral conformacionalment flexible en les separacions cromatogràfiques enantioselectives

4.1.1. Precedents

Els estudis previs realitzats amb FEQs els SQs de les quals eren constituïts per oligoprolines substituïdes es va observar el comportament singular que presentaven segons el medi en el qual es trobaven immersos. En particular, l'enantioselectivitat dels esmentats SQs desapareixia quan s'utilitzava com a fase mòbil cloroform al 100% o mescles d'aquest dissolvent amb un alcà [87,91]. Aquests canvis en la capacitat enantioselectiva, que van demostrar ser reversibles, es podien atribuir a la possible variació conformacional en les que estan subjectes les cadenes de poliprolina.

Com és sabut, segons el medi en el qual es troben immerses les cadenes de poliprolina, aquestes adopten diferents combinacions de poblacions que abasten des d'una estructura PPII [61] (on tots els enllaços peptídics es troben en una configuració *E*, *trans*) fins a una estructura PPI [62] (tots els enllaços amida són *Z*, *cis*), passant per una infinitat de situacions intermèdies. És a dir, el canvi de composició de la fase mòbil pot comportar una alteració conformacional del SQ. Aquest canvi és reversible i moderadament lent. De fet, aquesta transició conformacional tarda de l'ordre d'hores en completar-se, un temps força més llarg del que es necessita per al simple condicionament de la columna que segueix a un canvi de condicions cromatogràfiques.

4.1.2. Desenvolupament

Per tal d'estudiar aquest fenomen, les seves conseqüències en l'enantioselectivitat d'aquesta família de SQs i la seva generalització a altres cadenes d'oligoprolina, en aquest article es presenta el nou SQ, **SQ5**. Per aquest es descriu un mètode de síntesi en fase sòlida que permet l'obtenció d'una octaprolina no substituïda amb un grup trimetilacetil (Tma) com a grup terminal. També es descriu la seva caracterització per MS/MALDI-TOF, el procés d'escalat de la síntesi emprant un sintetitzador automàtic, així com la posterior fixació de l'entitat química resultant sobre sílice gel, la matriu cromatogràfica.

Tot seguit, en l'article s'estudia en el comportament cromatogràfic de la fase estacionària resultant. En primer lloc, es realitza un estudi comparatiu, entre dues FEQs d'interès, la ja estudiada poli-(4R)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-L-prolina (**FEQ-2**) i la nova derivada d'octaprolina (**FEQ-5**) (Figura 4.1). En aquest punt es consideren els factors de retenció *k*, els factors de separació α , i les resolucions *R_s*. També es té en compte l'ordre d'elució dels enantiòmers en les dues columnes. L'objectiu principal rau en determinar el paper del substituent aromàtic que conté

cada unitat de prolina del SQ substituït i el seu impacte en la capacitat enantioselectiva.

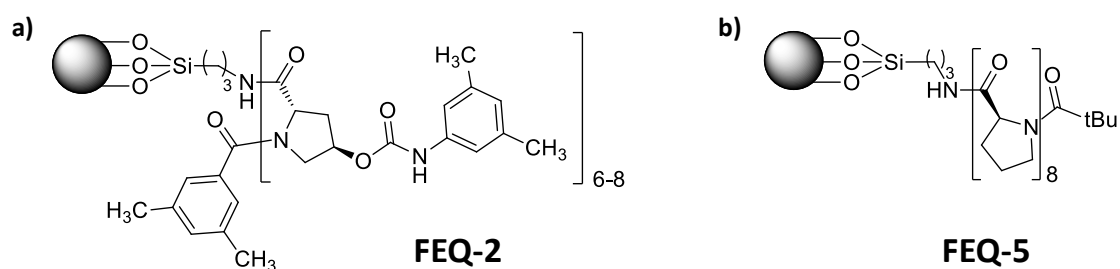


Figura 4.1. Fases estacionàries quiral emprades en aquest estudi [113]. a) **FEQ-2** que correspon a **CSP-2** en l'article. b) **FEQ-5** que correspon a **CSP-1** en l'article.

El treball també aborda la ja mencionada dependència entre l'enantioselectivitat i la composició de la fase mòbil, i per això es testen dissolvents de diferent naturalesa. S'estudia el comportament del nou SQ en absència de dissolvents pròtics no clorats, concretament s'utilitza MTBE com a modificador de la polaritat. La predilecció per aquest dissolvent rau no només per l'absència d'un donador de protons que sigui capaç de competir amb els analits, sinó que també ens interessa la seva pobra capacitat de solvatació.

D'altra banda, s'utilitzen també dissolvents apròtics clorats en la fase mòbil, que causa una significant pèrdua de l'enantioselectivitat, tal i com succeïa en el cas de les oligoprolines polisubstituïdes. Aquestes observacions cromatogràfiques es relacionen amb els resultats teòrics del grup de Cann [98,99] i les observacions espectroscòpiques de Li [93] i col·laboradors. Tot plegat permet establir el canvi conformacional com a causant del comportament cromatogràfic observat pels SQs tipus oligoprolina segons la fase mòbil emprada.

Finalment, en l'estudi es descriu el procés de transició conformacional des d'un punt de vista absolutament cromatogràfic. Per tal d'estudiar aquest fenomen, s'examina, en primer lloc, la pèrdua d'enantioselectivitat en passar d'una fase mòbil no clorada, a una de clorada. Llavors, es confirma la reversibilitat d'aquest procés per dos camins diferents: i) tornant a les condicions no clorades inicials, ii) afegint una petita quantitat d'un dissolvent pròtic a la fase mòbil. La diferència en el temps (volum de dissolvent) requerit per assolir l'estat d'equilibri en cadascuna de les condicions, el paper que els dissolvents pròtics juguen sobre les cadenes helicoïdals de poliprolina permeten discutir la reversibilitat i l'asimetria d'aquest procés conformacional.

4.1.3. Conclusions

La majoria d'analits es resolen millor emprant la **FEQ-5**, a excepció d'aquells que contenen grups π -acceptors tipus 3,5-dinitrobenzoil. Per tant, les observacions condueixen a pensar que ens trobem davant de dos mecanismes d'enantioreconeixement parcialment diferents per **FEQ-2** o **FEQ-5**. Mentre que l'atribuït al **SQ5** es basa íntegrament en l'establiment d'interaccions de pont d'hidrogen entre analit i SQ, les interaccions electròniques complementàries tipus π - π tenen un paper important en el mecanisme d'enantioselecció del **SQ2**. Per altra banda, la millor enantioselectivitat que presenta el **FEQ-5** està relacionada amb la fàcil accessibilitat i la disposició dels grups carbonil de l'esquelet de poliprolina, facilitant així les interaccions d'enllaç d'hidrogen.

Quan s'utilitzen dissolvents clorats en la fase mòbil, aquests promouen un canvi de conformació del SQ, incrementant la població de diversos confòrmers i obtenint una estructura més desordenada i flexible. Això es tradueix en una menor, i en ocasions quasi inapreciable enantioselectivitat. No obstant, aquest procés és reversible al tornar afegir alcohol en la mescla de dissolvents, conferint rigidesa i compactació a l'estructura quiral.

Article I [113]

Arnau NOVELL, Cristina MINGUILLÓN*, “Octaproline, a conformationally flexible chiral selector in liquid chromatographic enantioseparation”, *Journal of Chromatography A*, 1363 (2014) 109-118

Índex d'Impacte (JCR 2014): **4,169**

Posició en l'àrea de Química Analítica (JCR 2014): **6/74**



Octaproline, a conformationally flexible chiral selector in liquid chromatographic enantioseparation



Arnau Novell^{a,b}, Cristina Minguillón^{a,b,*}

^a Food and Nutrition Torribera Campus, University of Barcelona, Prat de la Riba 171, E-08921-Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain

^b Pharmaceutical Chemistry Laboratory, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 March 2014

Received in revised form 2 May 2014

Accepted 6 May 2014

Available online 14 May 2014

Keywords:

Poly-L-proline oligomers

Oligoproline

Chiral selector

Enantioseparation

Chiral stationary phases

PPII conformation

ABSTRACT

A proline octapeptide-derived chiral selector (CS) end-capped using a pivaloyl group was covalently linked to a silica gel chromatographic matrix by the C-terminal group. The chromatographic behaviour of the resulting chiral stationary phase (CSP) using different conditions was compared to those containing 3,5-dimethylphenylcarbamate residues on the proline units. An enantioseparation ability highly dependent on the mobile phase used is observed for these CSPs. When mixtures of alkane/alcohol or alkane/ether are used as mobile phase a similar enantioselectivity is obtained. Nevertheless, in the presence of chlorinated solvents, and without a hydrogen bonding donor in the mobile phase, enantioselectivity is extremely reduced. The reversibility of this phenomenon, attributed to a conformational change in the CS, is examined.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

One of the most striking and recent novelties in liquid chromatographic enantioseparation is the recognition of the outstanding and, in some way, unexpected enantioselectivity provided by oligopolyproline-derived chiral stationary phases (CSPs). Oligoproline-derived CSPs, which were firstly introduced by Li and co-workers [1], share some features in common with brush-type CSPs. The most remarkable is the relatively low-molecular weight of the chiral selector (CS). However, some chemical differences, namely low functionality and lack of aromatic rings in the CS, together with a broader selectivity [2,3], seems to point to the fact that we are facing a new class of peptide-based CSPs, as it is recognized by some authors [4].

In our previous studies on oligoproline we have compared CSPs containing as CS a single proline moiety, having a 3,5-dimethylphenylcarbamoyloxy group in the pyrrolidine ring, with those containing an oligoproline analogously derivatized [5,6]. Derivatization was introduced with the aim to provide the CS

with more interaction sites able to act in the recognition of solutes, and also to introduce some analogy with the polysaccharide derivatives most used for enantioseparation purposes (3,5-dimethylphenylcarbamates of amylose and cellulose). However, the enantioseparation of aromatic-ring-containing racemates clearly demonstrated that the derivatized oligoproline CS was able to resolve compounds containing aromatic rings with the same electronic character (π -donor) than those on the CS, thus questioning the role of the derivatization. Nevertheless, it was made evident the broader application domain of oligoproline derivatives vs single proline derived CSPs, as well as an interesting higher loading capacity. Considering the similar density of proline units on the studied mono/oligoproline CSPs, these observations could only be explained by the presence of polyproline helical structures able to interact several at the same time with the analyte in the recognition process.

The former substituted oligoproline derived CSPs also showed a particular behaviour depending on the solvent used in the mobile phase. Concretely, enantioselectivity was reversibly lost when chloroform 100% or mixtures of this solvent with heptane, were used as mobile phase. These changes in enantioselectivity could be attributed to the known conformational change from PPII [7] (PolyProline II has all amide groups in *trans* configuration) to PPI [8] (PolyProline I has all amide groups in *cis* configuration) helical structures or any intermediate situations. It is known that PPII helices dominate in most solvent systems while PPI are

* Corresponding author at: Food and Nutrition Torribera Campus, University of Barcelona, Verdager Building, Office No. 12, Prat de la Riba 171, E-08921-Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 403 37 87.

E-mail addresses: cminguillon@ub.edu, cristina.minguillon@gmail.com (C. Minguillón).

only favoured in some solvents [9]. The reversible conformational change from one conformation to the other takes in the order of hours to be completed, much longer than conventional conditioning of the chromatographic column in normal phase conditions.

The goal of this work is to study this phenomenon, its consequences on chromatographic enantioselectivity, and its extensibility to non-substituted oligoproline-CS. With this aim, an octaproline peptide was synthesized and bonded to a chromatographic matrix. The chromatographic behaviour of the resulting non-substituted oligoproline-derived CSP was compared to that of a CSP containing 3,5-dimethylphenylcarbamate residues on proline units (Fig. 1) using different chromatographic conditions. The enantioseparation ability resulted to be highly dependent on the mobile phase in the two cases. This phenomenon is proved to be reversible and consistent with a conformational change of the CS.

2. Experimental

2.1. Abbreviations

ACN, acetonitrile; CITrR-Cl, 2-chlorotriethyl chloride resin; DCM, dichloromethane; DEA, diethylamine; DIC, diisopropylcarbodiimide; DIEA, N,N-diisopropylethylamine; DMF, N,N-dimethylformamide; EEDQ, 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline; EtOH, ethanol; L-Fmoc-Pro-OH, 9-fluorenylmethoxycarbonyl-L-proline; HBTU, O-benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate; HMDS, hexamethyldisilazane; HOBt, 1-hydroxybenzotriazole; MeOH, methanol; MTBE, methyl t-butyl ether; TFA, trifluoroacetic acid; Tma, trimethylacetic acid.

2.2. General supplies and equipment

CITrR-Cl (100–200 mesh, 1% DVB, 1.3 mmol/g, NovaBiochem, Läufeldingen, Switzerland) was used as a supporting resin in solid phase synthesis. Chemicals and solvents were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany), NovaBiochem (Darmstadt, Germany) and Panreac (Barcelona, Spain).

Elemental analyses were performed by the Scientific and Technological Centres (University of Barcelona) using a Thermo Organic Elemental Analyzer, Flash 2000. MALDI-TOF Mass spectrometry was performed on a 4700 Proteomic analyzer (Applied Biosystems). The scaled-up synthesis was performed on an automatic peptide synthesizer Abi 433 A (Applied Biosystems). The CSP was packed into stainless-steel tubes (100 mm × 4.6 mm id) by the slurry method.

The chromatographic assays were carried out on a Waters HPLC system (Mildford, MA, USA) consisting of 1525 binary HPLC pump, 717plus autosampler and a 2467 dual λ UV Absorbance Detector. Retention factor (k) was calculated as $(t_r - t_0)/t_0$ being t_r the retention time and t_0 the void time. The enantioseparation factor (α) was calculated as the ratio of the retention factors for the two enantiomers. The void volume (t_0) was determined with 1,3,5-tri-*tert*-butylbenzene. Flow rate was fixed at 1 mL/min and UV detection was either 220 nm or 254 nm, depending on the analyte used. Analytes 1–12 and 22–24 were synthesized in our laboratory by conventional procedures and spectroscopically characterized. The elution order of enantiomers was determined by injecting the enantiomerically pure compound when it was available. CSP-2 was prepared as reported in a previous study [5].

2.3. Synthesis of the octaproline CS

Analogously to what is described [1] (Fig. 2), to CITrR-Cl (100–200 mesh, 506 mg, 1.30 mmol/g) washed and pre-swelled with DCM (5 mL × 1 min × 4) the mixture of L-Fmoc-Pro-OH

(129 mg, 0.38 mmol) and DIEA (133 μ L, 0.76 mmol) in 5 mL of DCM was added. Additional 399 μ L (2.28 mmol) of DIEA was added after 3 min and the mixture was allowed to react for 75 min. The unreacted 2-chlorotriethyl chloride groups on the resin were end-capped by the treatment with 405 μ L of MeOH (30 min). Washings with DMF (5 mL × 4) and DCM (5 mL × 4) were performed. The Fmoc-protecting group was removed by treating the resin with 4 mL of 20% (v/v) piperidine in DMF for 5 min. This operation was repeated two more times (10 + 10 min). The 9-methylenefluorene produced was collected and quantified by UV absorption at 290 nm. The actual functionalization attained on the resin was determined to be 0.59 mmol/g [10].

The mixture of L-Fmoc-Pro-OH (308 mg, 0.91 mmol), HOBt (138 mg, 0.91 mmol) and DIC (140 μ L, 0.91 mmol) in 3 mL of anhydrous DMF was added to the CITrR-Pro-H resin prepared above. After stirring for 2 h, the resin was filtered and washed with DMF (5 mL × 4) and DCM (5 mL × 4). The Fmoc group was then removed with piperidine. The next six amino acids were coupled following exactly the same procedure for coupling/deprotection. The successive coupling of Pro units was periodically controlled on the basis of 9-methylenefluorene UV determination after Fmoc cleavage.

Finally, pivalic acid (93 mg, 0.91 mmol) was coupled to the CITrR-Pro₈-H using HOBt (138 mg, 0.91 mmol) and DIC (140 μ L, 0.91 mmol) as coupling agents. The free peptide was cleaved from the resin by the treatment with 3% (v/v) TFA in DCM (5 mL × 5). The liquors obtained from this treatment were collected and co-evaporated several times with DCM (25 mL). The resulting oily residue was precipitated in diethyl ether and collected by centrifugation. The solid was dissolved in ACN/water (50:50) and finally lyophilized. The purity of the resulting peptide was checked by HPLC (k : 3.1; Column: Symmetry[®] C18, 5 μ m, 150 mm × 4.6 mm id.; mobile phase: linear gradient from 0 to 100% ACN (0.04% in TFA) in 15 min; Flow rate: 1 mL/min, λ : 214 nm) and characterized by MALDI-TOF MS (m/z : [M+Na] 901.46, [M+K] 917.43).

When the synthesis was performed in an automatic synthesizer HBTU and DIEA were used instead of DIC and HOBt as coupling agents.

2.4. Preparation of CSP-1

To a solution of HO-Pro₈-Tma (400 mg, 0.45 mmol) in 40 mL of DCM, EEDQ (240 mg, 0.94 mmol) and γ -aminopropylsilica gel (2 g), obtained from spherical silica gel (5 μ m, 100 Å, Kromasil) following the conventional procedure [11,12] (Elemental analysis: C, 4.48%; H, 1.20%; N, 1.45%), were added. The suspension was allowed to react overnight at room temperature. The resulting bonded silica gel was collected by filtration, washed exhaustively with DCM and toluene (elemental analysis: C, 11.20%; H, 1.98%; N, 2.96%, 235 μ mol CS/g CSP or 1.9 mmol Proline/g CSP, calculated on the basis of nitrogen percentage). The solid material was suspended in toluene (10 mL) and HMDS (1 mL) was added. The mixture was allowed to react for 1 h at reflux temperature. The resulting modified silica gel was collected by filtration, washed exhaustively and consecutively with toluene, DCM, EtOH and water until neutral washing liquors were obtained, EtOH, acetone and diethyl ether, and dried in vacuum at room temperature [5] (elemental analysis: C, 11.84%; H, 2.07%; N, 2.70%).

3. Results and discussion

Given their ready availability as enantiomerically pure compounds, many amino acids have been used as chiral moieties in Pirkle-type CSPs [13]. Among these, L-proline constitutes a particularity from the structural point of view. Proline is the only proteinogenic amino acid provided with a secondary amino group.

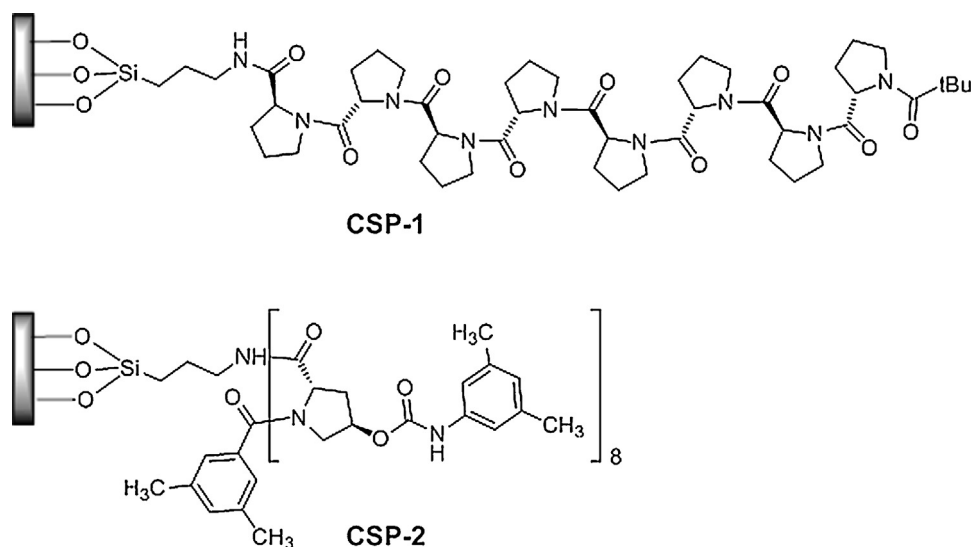


Fig. 1. Chemical structures of the CSPs used in the study.

When involved in peptides, prolines lack of hydrogen on the amide group. Consequently, the common alpha helix conformation is not possible.

Also, the N–CO group involving proline in peptides has different conformational characteristics regarding those of all other proteinogenic amino acids. *Trans* configuration (carbonyl oxygen and alpha carbon of the amino acid in opposite sites respect to the N–CO bond) is energetically favoured respect *cis* configuration. However, when proline is involved the difference in stability for these two configurations is not significant, which results in an equilibrated population of the two forms [14,15]. As a consequence, polyprolines adopt a rigid backbone able to switch between different conformational structures that go from PPI (all N–CO bonds in *cis* configuration) to PPII (all peptide bonds in *trans* configuration) as

a function of the solvent present [16,17]. From a chromatographic point of view, it could be expected a different selectivity for PPI, PPII or intermediate forms.

In this context, the preparation of a CSP with a relatively long oligoproline CS without substitution (8 proline units) was considered. The synthesis of the octapeptide using a SPPS (Solid Phase Peptide Synthesis) approach, was less time-consuming and economically cheaper respect to those prepared previously [5,6] due to the fact that derivatization of proline could be avoided. A trimethylacetyl group (Tma) [2,3] was chosen as terminal group. The synthesis of the oligopeptide onto a polystyrene resin, from which it has to be cleaved before bonding onto the chromatographic matrix, permits the full and accurate characterization of the CS before bonding it to the silica matrix. This approach ensures

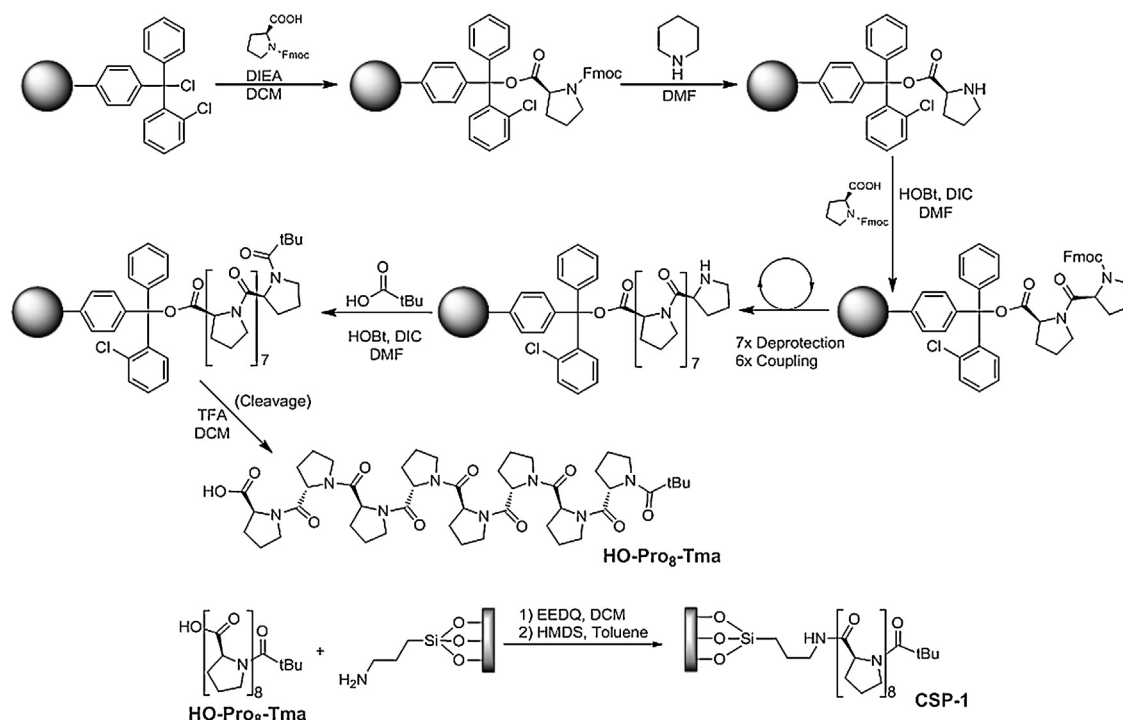


Fig. 2. Synthetic scheme followed in the preparation of CSP-1.

the fully characterized nature of the CS. The resulting peptide was attached to silica gel through an aminopropyl spacer. This was considered to provide a certain distance between the CS and the silica matrix and to improve the fixation of the voluminous oligomeric molecules.

3.1. Chromatographic test of CSPs

The choice of racemic test compounds is always a critical step for the evaluation of the performance of the CSPs. Results may be significantly biased depending on the analytes chosen for this purpose. Keeping this in mind, racemic analytes were chosen for comparative reasons according to previous experiments [5,6]. Given our interest in testing the significance of the aromatic group on polyproline CSs on separation, 25 racemic analytes containing aromatic groups were chosen (Fig. 3). Among them, compounds containing electron withdrawing nitro (2–5, 9, 22) or chloro groups (6, 10, 14, 23) on the aromatic rings, as well as hydrogen bond donor groups (1–12, 15, 18, 19, 20) or both (2–6, 9, 10) were tested. Other compounds included in the test series contained aromatic rings of π -donor character (1, 7, 8, 11, 12, 15–18, 21–24).

The two CSPs, bearing substituted and non-substituted oligoproline CSs, were firstly tested using Heptane/2-PrOH mixtures as mobile phase (Table 1). In these conventional conditions most analytes were better resolved on **CSP-1**. The exceptions to this general behaviour contain a π -acceptor dinitrobenzoyl group (3, 5, 9). The result could be expected considering the π -donor character of the substituent on **CSP-2**. However, in spite of the absence of any aromatic π - π interacting group, **CSP-1** showed significantly higher enantioselectivity for analytes with aromatic π -donor groups (1, 7, 8, 11, 12, 18, 21) or dichlorobenzoyl groups (6, 10). When the elution order of enantiomers was determined, the two columns showed higher affinity for the *S*-enantiomer. Given the magnitude of enantioselectivity values and the elution order observed for the two columns, the additional stereogenic centre on **CSP-2** proline units does not seem to affect recognition significantly.

Among non-resolved analytes, the absence of a hydrogen-bond donor group is frequent (13, 14, 16, 17, 22–24), which may be an indication of the relevance of hydrogen bonding on enantioseparation by oligoproline CSs. This is even more significant considering that the only organic functions present in the non-substituted oligoproline are carbonyl groups, hydrogen bond acceptors. This feature is made evident when comparing the series 22–24 with 9–11. The latter, amide derivatives thereby possessing a hydrogen bond donor group, are resolved regardless the character of the aromatic rings. However, even if the chemical backbone is similar in the two series, the former ester derivatives are not resolved. These observations suggest that the mechanism of enantioseparation can be partially different on these two CSs. On the one hand, the enantiorecognition of non-substituted **CSP-1** is mainly based on hydrogen bonding between CS and analytes. On the other hand, for substituted **CSP-2** additionally to these H-bonding, π - π interactions between the π -donor dimethylphenylcarbamate moieties and π -acceptor groups, when present, will have a role in the enantioselective interaction CS/analyte. Nevertheless, the broader enantioselectivity observed for **CSP-1** in most cases can be the result of an increased accessibility of analytes to the CS, devoid of the bulky dimethylphenylcarbamate groups.

3.2. Enantioselectivity dependence on mobile phase

To test the behaviour of the CSs in the absence of protic solvents [18], the CSPs were previously stored in heptane and afterwards conditioned in MTBE. Heptane was used to control retention time (Table 2). In spite of the lack of hydrogen bond donor ability of the mobile phase, **CSP-1** showed an enantioselective pattern similar to

that obtained in Heptane/2-PrOH (Table 1). Separation factors (α) were even higher than in the latter. Nevertheless, similar resolution values were observed due to the long peak tailing produced when MTBE was used (Fig. 4). This may be attributed to strong interaction between CSP and analytes. Considering the poor solvation capacity of MTBE and the absence of a protic solvent able to compete with the substrate for the interaction with the stationary phase, analytes undergo a slow adsorption–desorption kinetics, thereby resulting in tailing peaks. Consequently, hydrogen bonding between CS and analyte seems to be the major stereoselective interaction force acting in this case.

Chlorinated solvents, such as CHCl_3 and DCM, were also considered as non-protic solvents in the mobile phase. DCM was formerly used by Li and co-workers on similar CSPs [1–3]. In our case, **CSP-1**, previously stored in heptane, was fluxed overnight with a (40:60) mixture of Heptane/DCM at a flow rate of 1 mL/min. **CSP-1** stabilization was checked by the repeated injection of one of the analytes. Similarly to our previous studies on substituted oligoproline CSs [5,6], the use of aprotic chlorinated mobile phases caused an extreme decrease of enantioselectivity. This feature is even more remarkable for **CSP-1** given the absence of the aromatic substituent present in **CSP-2**. Also, racemic compounds containing a hydrogen bond donor group (5–12), which could be easily separated by **CSP-1** using standard normal-phase conditions (Heptane/2-PrOH) and also in non-protic Heptane/MTBE mixtures, were not separated using chlorinated mobile phases.

This result reinforces with chemical evidence the theoretical results obtained by Cann and co-workers [16,17]. These authors conclude that protic solvents alter the conformational distribution of CSs by introducing H-bonding. A more compact structure is present in protic solvents and, even in Hexane/2-PrOH, a 20% of carbonyl groups are calculated to be involved in H-bonding. In our previous studies [6], on the basis of CD and NMR spectra using diverse solvents, it was concluded that the use of chlorinated solvents as mobile phases involved a conformational disorder in the CS. This conformational disorder and increased flexibility may be at the origin of the enantioselectivity loss. In good agreement with this hypothesis, the addition of small amounts of 2-PrOH (2% v/v) to Heptane/DCM mixtures permits to recover a certain chromatographic enantioselectivity (Fig. 4).

CSP-1, as formerly **CSP-2** [5], was also tested in reversed-phase conditions (ACN/water and MeOH/water, at several ratios). However, it was not possible to produce neither a significant retention nor enantioselectivity for any of the compounds tested. In these conditions, water competes with analytes for H-bonding sites in the CS, thus preventing interaction between analytes and CS. This is in good agreement with the significant role attributed to H-bonding in enantiorecognition by **CSP-1**.

3.3. Loss and recovery of enantioselectivity

The change in enantioselectivity, when non-chlorinated mobile phases are replaced by chlorinated, attracted our attention given the singularity that it implies. Chlorinated solvents are common constituents of mobile phase for CSP containing low-molecular-weight CSs. Moreover, the change in chromatographic behaviour was observed to take longer time than the simple stabilization of the column in a new mobile phase. Thus, some studies were undertaken to examine this observation.

Firstly, the loss of enantioselectivity when changing from non-chlorinated to chlorinated mobile phases was examined. Once the column was determined to be stabilized in Heptane/2-PrOH (70:30) by injecting repetitively analyte **8**, it was fluxed for 30 min with the same mixture and additionally 60 min with 100% Heptane. The column was stored for 40 min at 60 °C to ensure the most stable conformation for the CS in this solvent. Once room temperature

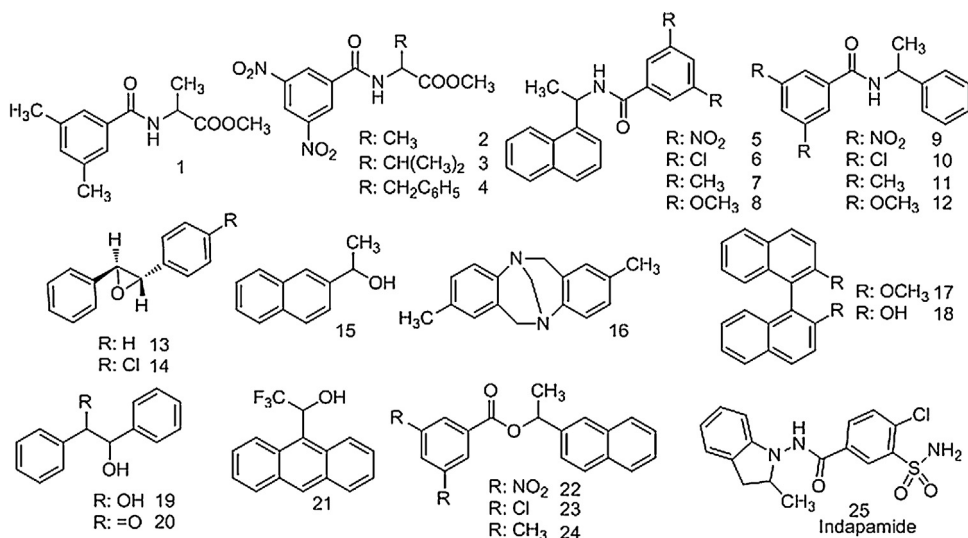


Fig. 3. Structures of the test compounds used in the study.

Table 1

Chromatographic results obtained using Heptane/2-PrOH mixtures as mobile phase.

Racemic compounds	MPHeptane/2-PrOH	CSP-1			CSP-2		
		k_1^a	α	R_s	k_1	α	R_s
1	90:10	3.92 ^b (R)	1.12	0.91	1.88	1.00	–
2	90:10	11.47 ^b (R)	1.11	0.77	7.86(R)	1.02	–
3	90:10	8.95 ^b (R)	1.11	0.96	3.05(R)	1.15	0.73
4	90:10	4.46 ^b (R)	1.12	1.01	6.41	1.00	–
5	90:10	2.41(R)	1.65	1.87	4.23(R)	3.33	6.96
6	90:10	1.13	1.86	3.16	1.47	1.35	1.67
7	90:10	1.72	1.98	3.70	2.70	1.32	1.57
8	90:10	2.57	2.31	4.61	6.48	1.23	0.83
9	90:10	5.37 ^b (R)	1.24	1.51	4.10(R)	2.09	4.15
10	95:5	1.93(R)	1.19	1.37	2.72(R)	1.14	0.59
11	95:5	2.86(R)	1.15	0.89	5.10(R)	1.07	–
12	95:5	4.18(R)	1.19	1.31	11.46(R)	1.08	0.37
13	98:2	0.20	1.00	–	0.13	1.00	–
14	98:2	0.21	1.00	–	0.16	1.00	–
15	98:2	4.95	1.00	–	3.57	1.00	–
16	98:2	0.85	1.00	–	1.05	1.00	–
17	98:2	0.85	1.00	–	0.31	1.00	–
18	90:10	9.63	1.15	0.77	10.30	1.00	–
19	90:10	2.19	1.10	0.43	4.83	1.00	–
20	98:2	2.92	1.00	–	2.09	1.00	–
21	95:5	4.24(R)	1.50	3.05	4.03 ^b (R)	1.00	–
22	98:2	0.63	1.00	–	1.17	1.00	–
23	98:2	0.14	1.00	–	0.11	1.00	–
24	98:2	0.24	1.00	–	0.19	1.00	–
25	80:20:0.2 ^c	6.80	1.13	0.63	2.68	1.00	–

^a In parentheses the absolute configuration of the first eluted enantiomer.

^b Mobile phase: Heptane/2-PrOH (98:2).

^c 0.2% of TFA was added to the mobile phase.

Table 2

Chromatographic results obtained using Heptane/non-protic solvent mixtures as mobile phase.

Racemic compounds	Heptane/MTBE (40:60)			Heptane/CHCl ₃ (25:75)		Heptane/DCM (40:60)	
	k_1	α	R_s	k_1	α	k_1	α
5	1.67 ^a	2.44	4.28	8.97	1.11	12.61	1.00
6	1.95	2.31	3.93	2.64 ^b	1.11	1.37	1.00
7	3.49	2.11	2.77	5.14 ^b	1.00	2.87	1.00
8	2.53 ^a	2.76	2.59	3.93	1.00	3.42	1.02
9	7.66	1.40	2.36	14.29	1.09	14.24	1.00
10	9.19	1.21	1.00	1.25	1.00	1.77	1.00
11	1.52	1.43	1.78	4.61	1.00	5.21	1.00
12	4.04	1.18	0.71	5.76	1.00	6.45	1.00

^a Mobile phase: MTBE 100%.

^b Mobile phase: Heptane/CHCl₃ (50:50).

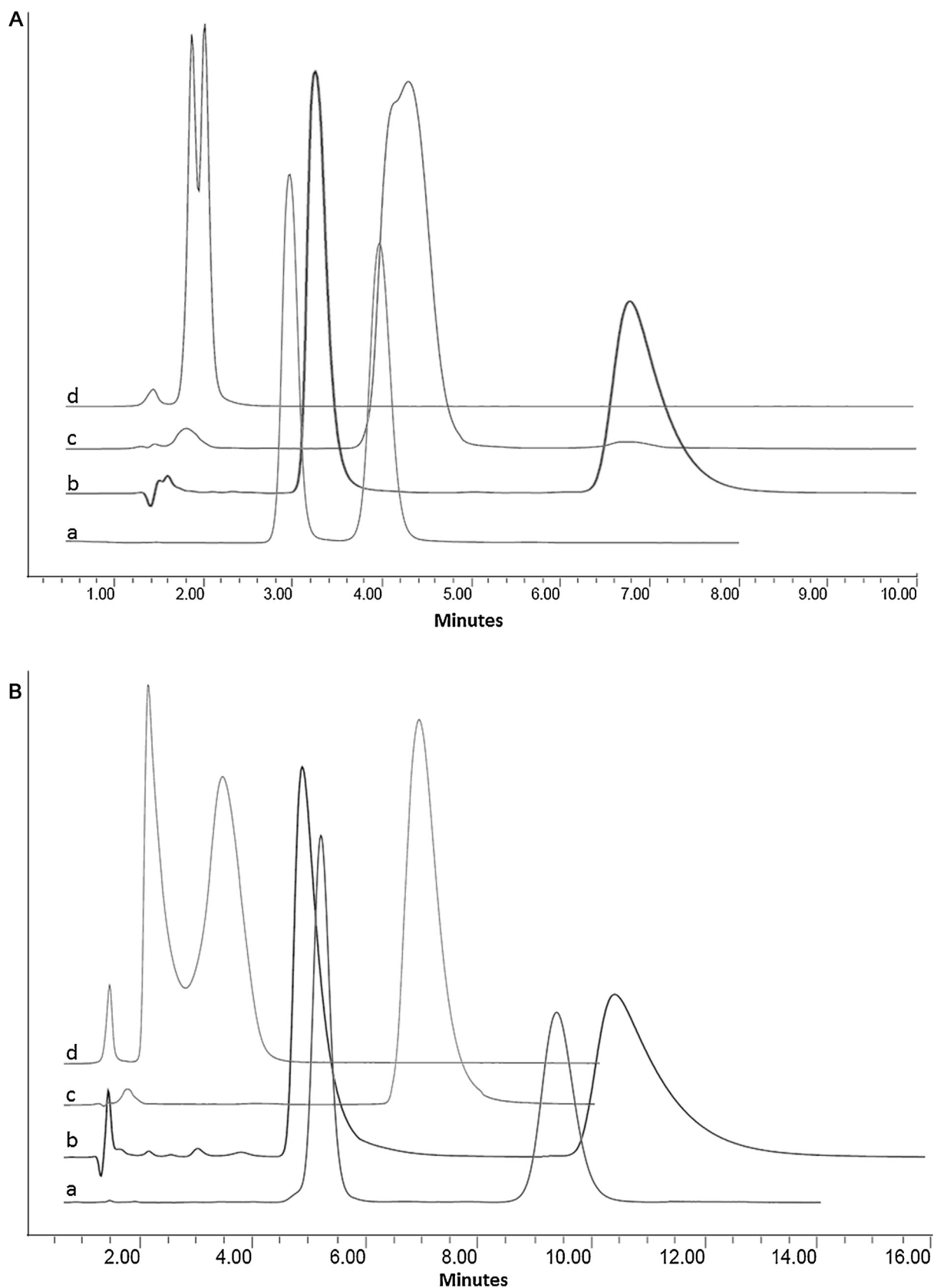


Fig. 4. Chromatographic enantioseparation of **6** (A) and **8** (B) on CSP-1 using diverse mobile phase compositions: (a) Heptane/2-PrOH (90:10); (b) Heptane/MTBE (40:60) for **6** and 100% MTBE for **8**; (c) Heptane/DCM (40:60); (d) Heptane/DCM/2-PrOH (40:60:1).

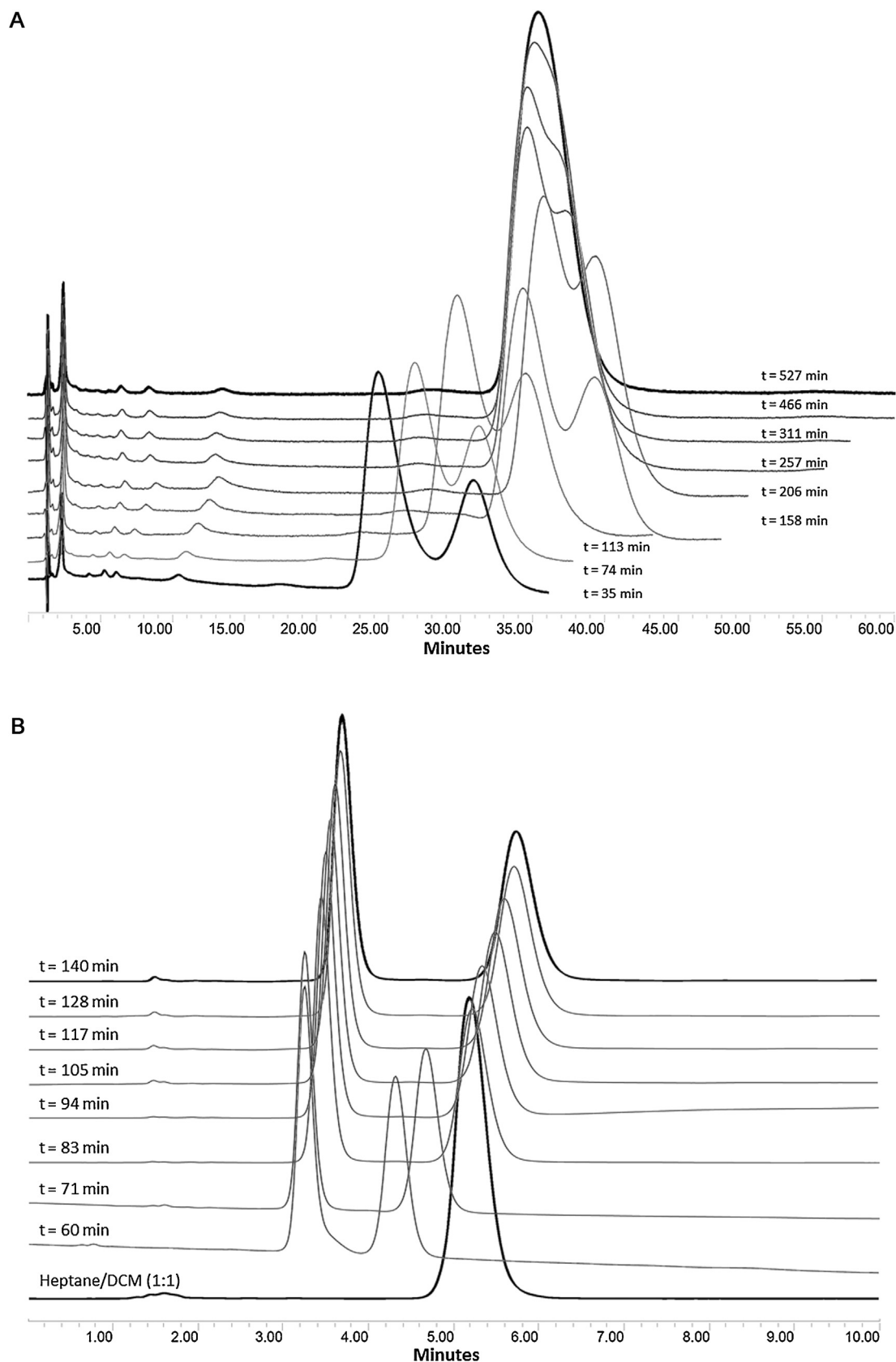


Fig. 5. (A) Study of the decrease in enantioselectivity for **12**. Mobile phase: Heptane/DCM (50:50), flow rate: 1.0 mL/min, column temperature: 22 °C, and UV detection at 254 nm. (B) Recovery of enantioselectivity for **7**. Mobile phase: Heptane/2-PrOH (90:10), flow rate: 1.0 mL/min, column temperature: 22 °C, and UV detection at 254 nm (experimental details in the text).

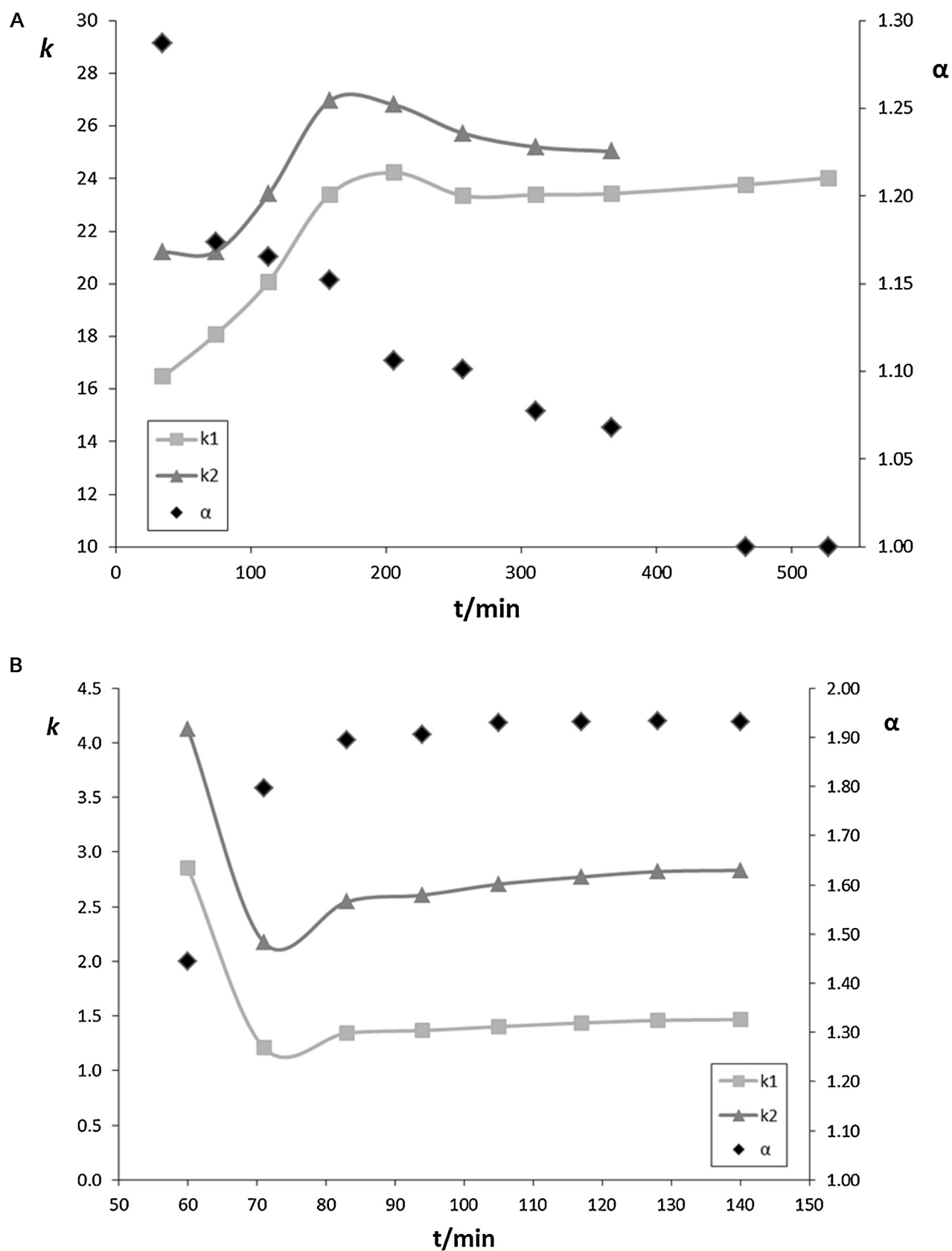


Fig. 6. Evolution of retention factors (k_1 and k_2) and enantioselectivity factor (α) with time during the process of loss of enantioselectivity for **12** (A) and recovery of enantioselectivity for **7** (B).

Table 3
Chromatographic data corresponding to loss/recovery of enantioselectivity on **CSP-1**.

Racemic compound	t_{inj} (min)	t_1 (min)	t_2 (min)	k_1	k_2	α
12^a	35	24.45	31.07	16.48	21.21	1.29
	74	26.77	31.18	18.08	21.22	1.17
	113	29.83	34.53	20.08	23.40	1.17
	158	34.53	39.57	23.38	26.95	1.15
	206	35.75	39.39	24.23	26.80	1.11
	257	34.50	37.86	23.35	25.71	1.10
	311	34.48	37.04	23.38	25.20	1.08
	367	34.62	36.88	23.43	25.03	1.07
	466	35.05	–	23.77	–	1.00
	527	35.33	–	24.02	–	1.00
12^b	40	9.27	10.62	5.18	6.08	1.17
	61	13.99	16.90	8.32	10.26	1.23
	82	10.89	13.33	6.25	7.88	1.26
	104	10.74	13.26	6.15	7.84	1.27
	126	10.71	13.27	6.13	7.84	1.28
	147	10.83	13.45	6.22	7.96	1.28
	168	10.84	13.47	6.22	7.97	1.28
	190	10.82	13.47	6.21	7.97	1.28
	211	10.86	13.53	6.24	8.01	1.28
	232	10.88	13.54	6.25	8.02	1.28
7^c	60	3.25	4.31	2.86	4.12	1.44
	71	3.25	4.67	1.21	2.17	1.80
	83	3.45	5.21	1.34	2.54	1.89
	94	3.50	5.34	1.37	2.61	1.91
	105	3.56	5.50	1.40	2.71	1.93
	117	3.62	5.61	1.44	2.77	1.93
	128	3.67	5.71	1.46	2.82	1.93
	140	3.70	5.74	1.47	2.83	1.93

^a From Heptane/2-PrOH (95:5) to Heptane/DCM (50:50).^b From Heptane/DCM (50:50) to Heptane/2-PrOH (95:5).^c From Heptane/DCM (50:50) to Heptane/2-PrOH (90:10).

was recovered the experiment started by fluxing the column with a Heptane/DCM (50:50) mixture at a 1 mL/min flow rate. After 35 min, considered enough time for a 10 cm-length Pirkle-type column to be stabilized in the new conditions, the analyte (**7** or **12**) was injected sequentially at given time intervals until a single peak of repetitive retention time was obtained (Table 3 and Fig. 5a). Working at 22 °C, a symmetrical peak (retention time 35.3 min; $k_1 = 24.0$) was obtained for compound **12** after 527 min (8.78 h) of using the above mentioned conditions.

The reverse process was afterwards studied on the same column. **CSP-1**, already stabilized in Heptane/DCM (50:50), was fluxed with 100% Heptane for 30 min and, subsequently, with a mixture of Heptane/2-PrOH (90:10) for additional 30 min. After this point the analyte (**7** or **12**) was injected repetitively until reproducible results were obtained (Table 3 and Fig. 5b). At 22 °C, enantioselectivity was fully recovered after 140 min for compound **7** and 126 min for **12**.

The difference in the time needed to reach equilibrium for the two inverse processes (loss and recovery of enantioselectivity) seem to point to a difference in stability for the conformation attained by the CS in the two conditions. According to what is described by Chiang et al. [9], the transition from PPII to PPI is much longer than the inverse process PPI to PPII. This fact corroborates the chromatographic results obtained. Thus, while the loss of enantioselectivity in Heptane/DCM mixtures is a slow process, the CS easily recovers the conformation needed to show enantioselectivity when 2-PrOH is included in the mobile phase (Fig. 6).

Considering the calculated results and conclusions of Ashtari and Cann [17], in Hexane/2-PrOH the conformational rigidity increases with length reaching over 83% of a single conformation for a hexamer of proline. Taking into account the length of the CS in **CSP-1**, it can be assumed that an almost single conformation exists in Heptane/2-PrOH. In spite of the expectable conformational diversity produced in the presence of chlorinated solvents (apparently an entropically favoured situation), the

single more ordered/rigid conformation appears to be energetically favoured as it is supported by the two chromatographic experimental observations: (i) the quick recovery of enantioselectivity when Heptane/2-PrOH (90/10) is reintroduced in the column, (ii) the recovery of enantioselectivity after the addition of small amounts (1–2%) of alcohol in the chlorinated mobile phase. This hypothesis seems also to be in good agreement with the spectroscopic results obtained by P. Zhang and co-workers [19] for a decaprolin oligomer in solution containing or not 2-PrOH. Using diverse spectroscopic techniques (IR, VCD, ECD), the spectra of the decaprolin in the absence of 2-PrOH is significantly different from those obtained in the presence of this solvent, disregarding its content in the solution [19].

4. Conclusions

In conventional conditions most analytes, bearing an H-bond donor group, were better resolved on **CSP-1** than on **CSP-2**. The only exceptions are some racemic compounds bearing π -acceptor 3,5-dinitrobenzoyl groups (**3**, **5**, **9**). These results suggest that the enantioselective recognition mechanism in polypyrroline-derived CSPs is mainly based on hydrogen bond interactions for **CSP-1**, whereas π - π interactions may play a significant role on **CSP-2**. However, the higher enantioselectivity observed for **CSP-1** is attributed to the availability of the carbonyl groups of the oligoprolin backbone due to the lack of the voluminous dimethylphenylcarbamate groups. This availability is maintained in non-chlorinated solvents. When testing the behaviour of **CSP-1** in chlorinated-solvent-containing mobile phases separation factors decrease significantly. When these solvents are present in the mobile phase mixture, conformational disorder and increased flexibility in the CS are promoted.

This feature was proved to be reversible. A more ordered and rigid octaprolin conformation is rapidly recovered by either

adding a small amount of 2-PrOH in the mixture or by switching to conventional Heptane/2-PrOH normal phase conditions.

Acknowledgements

Financial support from the University of Barcelona is acknowledged. A. Novell acknowledges the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) of the Generalitat de Catalunya for a predoctoral fellowship.

References

- [1] J. Huang, P. Zhang, H. Chen, T. Li, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3301.
- [2] J. Huang, H. Chen, T. Li, *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 109.
- [3] J. Huang, H. Chen, P. Zhang, T. Li, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 307.
- [4] A. Cavazzini, L. Pasti, A. Massi, N. Marchetti, F. Dondi, *Anal. Chim. Acta* 706 (2011) 205.
- [5] R. Sancho, A.M. Pérez, C. Minguillón, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 905.
- [6] R. Sancho, C. Minguillón, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 93.
- [7] P.M. Cowan, S. McGavin, *Nature* 176 (1955) 501.
- [8] W. Traub, U. Shmueli, *Nature* 198 (1963) 1165.
- [9] Y. Chiang, Y. Lin, J. Horng, *Protein Sci.* 18 (2009) 1967.
- [10] Y. Wu, Y. Wang, a. Yang, T. Li, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1688.
- [11] L. Oliveros, C. Minguillón, B. Desmazières, P.-L. Desbène, *J. Chromatogr.* 589 (1992) 53.
- [12] L. Oliveros, C. Minguillón, T. González, *J. Chromatogr. A* 672 (1994) 59.
- [13] F. Gasparrini, D. Misiti, C. Villani, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 35.
- [14] W.J. Wedemeyer, E. Welker, H.A. Scheraga, *Biochemistry* 41 (2002) 14637.
- [15] A.H. Andreotti, *Biochemistry* 42 (2003) 9515.
- [16] M. Ashtari, N.M. Cann, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6331.
- [17] M. Ashtari, N.M. Cann, *J. Chromatogr. A* 1265 (2012) 70.
- [18] W. Lao, J. Gan, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5020.
- [19] P. Zhang, P.L. Polavarapu, J. Huang, T. Li, *Chirality* 105 (2007) 99.

4.2. Columnnes de sílice monolítica funcionalitzades amb selectors quirals derivats de poliprolina substituïda com a fases estacionàries quirals per a cromatografia d'alta resolució

4.2.1. Precedents

L'eix principal de la recerca del nostre grup ha estat el disseny, síntesi i optimització de diferents entitats químiques com a SQs que permetin la resolució d'un ampli ventall d'analits racèmics. No obstant, per tal de millorar la capacitat enantioselectiva de les fases estacionàries quirals també cal aprofitar les propietats intrínseques que ofereix la matriu cromatogràfica.

Les columnnes farcides de partícules han constituït la norma durant la major part de la història de la HPLC. La fase estacionària en les columnnes d'aquest tipus està constituïda per partícules d'una substància sovint inerta al procés cromatogràfic, la matriu cromatogràfica. Típicament aquesta matriu està formada per sílice que s'empaqueta dins d'un tub, sovint d'acer inoxidable. Dues limitacions bàsiques estan associades amb l'empaquetament tradicional de partícules de sílice quan es vol reduir el temps d'anàlisi incrementant el flux de la fase mòbil: i) l'increment de pressió en reduir la mida de les partícules i ii) l'eixamplament dels pics degut a la resistència de la transferència de massa entre fase estacionària i mòbil.

Les columnnes monolítiques posseeixen una estructura conceptualment diferenciada de les columnnes tradicionals. La seva constitució és més semblant a una barra amb una gran quantitat de canalització i afloraments disposats a l'atzar i interconnectats entre sí. Com que no hi ha partícules, tampoc hi ha buits interparticulars, fet que comporta la alta permeabilitat d'aquests materials. Consegüentment, la caiguda de pressió en la columna és petita. La qual cosa permet augmentar considerablement el flux de la fase mòbil i així reduir el temps total del cromatograma. Així es poden assolir les anomenades condicions de *high-throughput* (anàlisis ràpids). També, només una àrea molt petita de la superfície de la fase estacionària queda inaccessible a la fase mòbil i als analits que arrossega.

4.2.2. Desenvolupament

Considerant les propietats atribuïdes als monòlits com una alta eficiència i una alta capacitat de càrrega, el nostre grup va considerar l'estudi de la combinació d'aquestes matrius cromatogràfiques amb els SQs prèviament investigats en matrius particulades convencionals. Ens interessa el possible efecte sinèrgic en la capacitat de càrrega de la FEQ resultant. En conseqüència, s'aborda la combinació la ja reconeguda capacitat d'enantiosel·lecció dels SQs tipus oligoprolina substituïts amb les propietats

dinàmiques favorables que ofereixen els materials monolítics de sílice. Per tant, en el present capítol es descriu la fabricació de les dues primeres columnes quirals de la família dels derivats de la poliprolina (Figura 4.2). S'avaluen les propietats cromatogràfiques de les columnes modificades resultants, així com la seva capacitat enantioselectiva, capacitat de càrrega i propietats hidrodinàmiques.

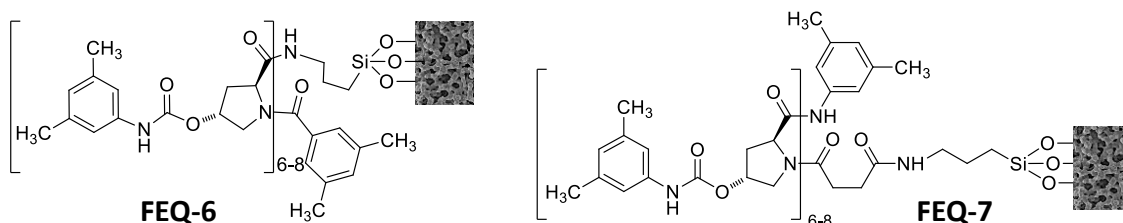


Figura 4.2. Fases estacionàries quirals emprades en aquest estudi [114]. a) **FEQ-6** que correspon a **CSP-1** en l'article. B) **FEQ-7** que correspon a **CSP-2** en l'article.

En aquest sentit, l'estudi comença amb la descripció de la modificació covalent *in situ* de dues columnes monolítics de sílice amb derivats de poli-(4R)-(3,5-dimetilfenilaminocarboniloxi)-L-prolina (**SQ2** i **SQ4**). Els SQs emprats havien estat prèviament sintetitzats en altres publicacions anteriors [87,91]. Addicionalment, **FEQ-2** es va sotmetre a un procés de *end-capping*. Un cop obtingudes les columnes resultants, es testen amb analits la separació dels quals ja es coneixia de l'estudi previ dels mateixos SQs en matrius particulades convencionals. Finalment, es determina el grau de derivatització de cada columna quantificant el contingut de SQ ancorat en cada cas.

Seguidament, es determina l'efecte que ha tingut la introducció del SQ en les columnes monolítics sobre dos paràmetres com són l'eficiència i la pressió del sistema. Per tal de valorar l'eficiència es calcula l'altura de plat teòric (H) per un compost no retingut a diferents fluxos de fase mòbil, primerament utilitzant una FEQ monolítica aminopropilada i, després emprant **FEQ-6**, és a dir, la mateixa fase ja derivatitzada amb el SQ, per tal de veure si la fixació del selector influencia el pas de la fase mòbil a través de la columna. Per altra banda, per tal d'estudiar la diferència de pressió entre una FEQ monolítica i la seva anàloga particulada, es mesura la pressió a diferents fluxos de fase mòbil. L'alta permeabilitat dels monòlits queda palesa en aquest darrer experiment.

S'analitza també el comportament cromatogràfic de les dues FEQs monolítics. El patró de retenció, la capacitat enantioselectiva i la resolució de les columnes monolítics es relacionen amb el grau de derivatització de les dues columnes fabricades. S'estableix una relació entre la densitat de SQ de la columna i les seves capacitats de retenció i separació. També es considera l'efecte del tractament d'*end-capping*, per comparació entre **FEQ-7**, sotmesa a aquest tractament, i **FEQ-6** que no ha

estat tractada i que, per tant, pot disposar de grups silanol lliures. També es té en compte la comparació entre aquestes columnes monolítiques i les seves anàlogues particulades respecte la quantitat de SQ que contenen i la matriu cromatogràfica de la qual estan constituïdes.

Finalment, la contribució que considerem més significativa d'aquest treball és l'estudi de la capacitat de càrrega. Ja en treballs anteriors el nostre grup havia mostrat interès per l'increment de la capacitat de càrrega [87,91] dels SQs tipus poliprolina, ja que aquesta és una propietat fonamental per a fins preparatius. Per això, es realitza un estudi comparatiu de la capacitat de càrrega entre les columnes monolítiques i les particulades, considerant el diferent grau de derivatització. Per tal de complementar aquest estudi, aprofitant l'alta retenció i enantioselectivitat de la **FEQ-6**, així com l'alta permeabilitat dels materials monolítics, també s'avalua l'efecte de l'increment del flux respecte la resolució de la columna, obtenint resultats significatius.

4.2.3. Conclusions

Les matrius monolítiques permeten la fixació una quantitat més gran de SQ sobre la FEQ respecte les columnes anàlogues particulades. Aquest fet es tradueix en una major retenció i en un comportament cromatogràfic i enantioselectiu significativament millor. Encara que les dues FEQs siguin diferents, sobretot per la diferent manera d'enllaçar-se el SQ al suport monolític de sílice, les dues són capaces de resoldre un espectre similar d'analits. Aquest fet indicaria que el mecanisme d'enantioreconeixement és el mateix, tot i que el patró de retenció exhibit és força diferent.

Comparant aquestes FEQs monolítiques amb les respectives particulades, les primeres estan més derivatitzades, és a dir, contenen una quantitat de selector quiral més gran per columna. Conseqüentment, les FEQs monolítiques presenten una capacitat de càrrega fins a 5 vegades superior. Altres factors com la major accessibilitat del SQ a l'analit també sembla que podria contribuir tant a millorar l'enantioselectivitat com la capacitat de càrrega, hipòtesi que s'abordarà amb més profunditat en el capítol següent. Finalment remarcar el fet que en aplicar fluxos de fase mòbil més elevats s'obtinguin cromatogrames més curts, tot mantenint-se els factors de separació, una observació que acosta aquest tipus de FEQs a les condicions tipus *high-throughput*.

Article II [114]

Raquel SANCHO, **Arnau NOVELL**, Frantisek SVEC, Cristina MINGUILLÓN*,
“Monolithic silica columns functionalized with substituted polyproline-
derived chiral selectors as chiral stationary phases for high-performance
liquid chromatography”, *Journal of Separation Science*, 37 (2014) 2805-
2813

Índex d’Impacte (JCR 2014): **2,737**
Posició en l’àrea de Química Analítica (JCR 2014): **21/74**

Raquel Sancho^{1,2}
Arnau Novell^{1,2}
Frantisek Svec³
Cristina Minguillón^{1,2}

¹Food and Nutrition Torribera Campus, University of Barcelona, Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain

²Laboratori de Química Farmacèutica, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain

³Molecular Foundry, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA, USA

Received June 11, 2014

Revised July 25, 2014

Accepted July 25, 2014

Research Article

Monolithic silica columns functionalized with substituted polyproline-derived chiral selectors as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography

In this study, two polyproline-derived chiral selectors are bonded to monolithic silica gel columns. In spite of high chiral selector coverage, the derivatization was found to have only a slight effect on the hydrodynamics of the mobile phase through the column. The enantioseparation ability of the resulting chiral monolithic columns was evaluated with a series of structurally diverse racemic test compounds. When compared to analogous bead-based chiral stationary phases, higher enantioseparation and broader application domain were observed for monolithic columns. Moreover, the increase in flow rate produces a minor reduction of resolution, which permits to shorten analysis time. Additionally, increased loadability defines chiral polyproline derived monoliths as adequate for preparative chromatography.

Keywords: Chiral selectors / Chiral stationary phases / Enantioseparation / Poly-L-proline oligomers / Silica monoliths
DOI 10.1002/jssc.201400640

1 Introduction

As a result of the increasing demand for enantiomerically pure compounds, the chromatographic tools that permit the analysis and production of single enantiomers occupy a relevant position among the most striking developments in separation science. Monolithic materials, either polymeric or based on silica gel, have rapidly become a popular media in diverse separation areas, such as HPLC and CEC [1–4]. Monolithic beds provide a number of advantages in LC because of the flow characteristics that they offer. Backpressures can be maintained <0.1 MPa with flow rates in the range of 0.5–1.0 mL/min. Reliability, high efficiency, high throughput, and high productivity are some of the advantages for these separation materials over conventional bead format [5]. Moreover, monoliths may provide a higher loading capacity, an interesting property for semipreparative/preparative and product scale separations.

Although silica-based monolithic columns are more advantageous than organic polymer based ones, there are only a limited number of studies describing the use of chiral stationary phases (CSPs) for HPLC based on monolithic silica gel. In this regard, the use of polysaccharide-derived chiral

selectors (CSs) either coated [6] or attached [7] on monolithic silica format have been studied. These columns combine the broad enantioselectivity of the CS with the ability to speed up separations. Preparation of *tert*-butyl carbamoylquinine-based monolithic silica columns and their application to ion-exchange chromatography was reported by Lindner et al. [8]. The same authors also studied the use of β -cyclodextrins as CSs bonded to silica monoliths [9]. Similar performance was obtained when derivatized monoliths were compared to the analogous particle-based columns. Nevertheless, monoliths were better adapted to high-throughput enantiomer separation.

One of the most recent discoveries in enantioselective chromatography is the unforeseen enantioselectivity of polyproline-derived backbones [10]. These structures are considered to constitute a new class of peptide-based CSs, even though they share some common features with brush-type CSs [10]. Li and co-workers were the first to apply them in CSPs [11–13] for HPLC. Interesting enantioselective performance was obtained. Studies with similar CSs were conducted by Lao and Gan who focused on short di/tripeptides of proline [14–17]. Nevertheless, the length of polyproline backbone determines the possibility for the CS to adopt a helical conformation, which seems to play a major role in enantiorecognition [12, 18, 19]. In a previous work on proline-type CSs, we introduced 3,5-dimethylcarbamoyloxy groups as substituents on proline. This substitution was inserted in order to provide the CS with more interaction sites able to act in the enantiorecognition mechanism with the analytes. When single proline-derived CSPs were compared to those containing an oligoproline analogously derivatized CS [20, 21], the

Correspondence: Professor Cristina Minguillón, Food and Nutrition Torribera Campus, University of Barcelona, Verdagué Building, Office N. 12 Prat de la Riba 171, E-08921-Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain
E-mail: cminguillon@ub.edu

Abbreviations: CS, chiral selector; CSP, chiral stationary phase

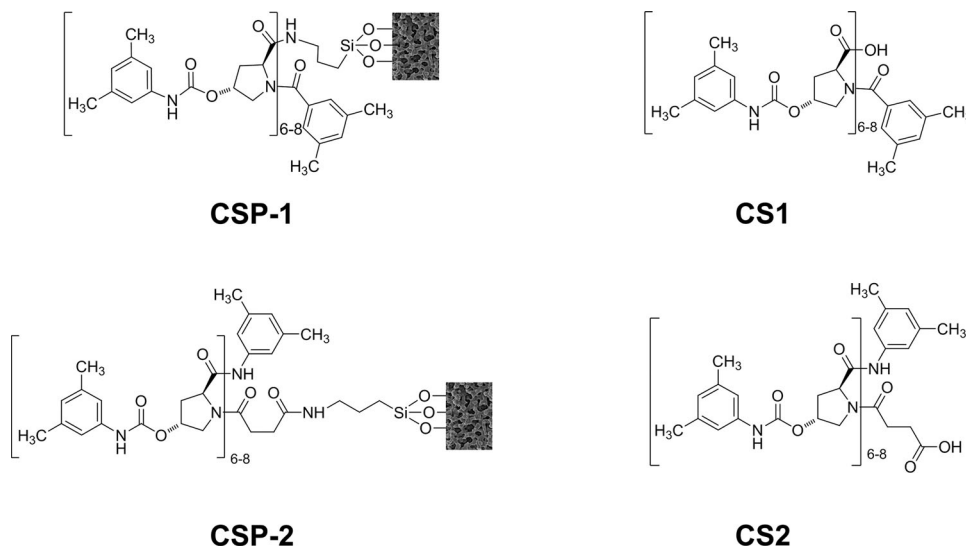


Figure 1. Chemical structures of the CSPs and their corresponding CSs.

latter helical structures showed a broader application domain and an increased loadability respect to monoproline-derived CSPs.

However, peptide CSs and their derivatives, polyproline among them, have not been yet applied to the monolithic format. Considering that this kind of CS is interesting from the point of view of the particular properties that polyprolines exhibit, the aim of this work is to fill this gap. Therefore, in this study polyproline-derived CSs are bonded to monolithic silica rods and the chromatographic performance of the resulting columns tested. The covalent modification of monolithic silica column with poly-(4*R*)-(3,5-dimethylphenylaminocarbonyloxy)-L-proline derivatives was performed *in situ*. The modified columns were tested to assess the effect of derivatization on the chromatographic performance of monoliths, to study the loading capacity provided by the resulting CSPs, and finally, results were compared to the previously prepared polyproline-derived bead-based columns [20, 21].

2 Materials and methods

2.1 General supplies and equipment

Monolithic silica gel columns (Onyx™, 100 × 4.6 mm) were purchased from Phenomenex (Torrance, CA, USA). 3-Aminopropyltriethoxysilane was supplied by Sigma-Aldrich (CA, USA). Solvents were provided by VWR international, Prolabo (Leuven, Belgium), and Panreac (Barcelona, Spain). The chromatographic assays were carried out on a Waters HPLC system (Milford, MA, USA) consisting of a 600E pump, a 717 autosampler, and equipped with a 996 photodiode-array detector. A syringe pump from Kd-scientific (Holliston, MA, USA) and a water bath from Polyscience 6600W (Niles, IL, USA) were used for column derivatization.

Retention factor (*k*) was calculated as $(t_r - t_0)/t_0$ in which t_r is the retention time and t_0 is the void time. The enantioseparation

factor (α) was calculated as the ratio of the retention factors for the two enantiomers. The void time (t_0) was determined with 1,3,5-tri-*tert*-butylbenzene. The concentration of the samples was 1 mg/mL and the injected volume 10 μ L. The elution order was determined when possible using compounds enriched with one of the two enantiomers of known absolute configuration.

Polyproline CSs (Fig. 1) were synthesized following the procedure described elsewhere [20, 21]. CSs were used as mixtures of oligomers of six to eight proline residues: **CS1** (6.3, 29.3, 64.4%) and **CS2** (2.6, 21.1, 76.3%) of six, seven, and eight proline units, respectively (calculated from HPLC analysis). The degree of CS immobilized into the column was quantified indirectly by the difference between the amount added and that recovered unreacted.

2.2 Preparation of aminopropyl-modified monolithic silica columns

An *in situ* derivatization procedure was followed for the preparation of the modified monolithic silica matrices from commercial columns [8]. Monolithic silica columns were washed with 10 mL of heptane at a flow rate of 0.2 mL/min before chemical modification. Subsequently, the columns were fluxed with 10 mL of anhydrous toluene at a flow rate of 0.2 mL/min. A solution (10 mL) of 1 mL of 3-aminopropyltriethoxysilane and 0.2 mL of dry pyridine in toluene was fluxed through the column at a flow rate of 0.05 mL/min. Temperature was maintained at 40°C using a water bath in which the column was immersed. The resulting aminopropyl silica monoliths were washed at 40°C with 45 mL of toluene at a flow rate of 0.5 mL/min. The system was allowed to cool to room temperature for the last 30 min.

2.3 Preparation of monolithic CSP-1

An aminopropyl-derived column was washed with 10 mL of anhydrous DMF at a flow rate of 0.5 mL/min. Concurrently,

a solution of 383.2 mg (0.18 mmol) of **CS1** and 144.7 mg (0.58 mmol) of 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline in 8 mL of anhydrous DMF was prepared. The column was first fluxed with the mentioned solution at a flow rate of 0.5 mL/min for 3 min. The remaining solution was fluxed through the column at a flow rate of 0.025 mL/min. Temperature was maintained at 40°C. The column was allowed to react overnight at 30°C. Finally, in order to remove the unreacted reagents, the column was sequentially washed with 10 mL of DMF, 10 mL of 2-PrOH, and with 10 mL of heptane using a 0.5 mL/min flow rate. The DMF solution washed out from the column was recovered. The solvent was evaporated and the residue redissolved in dichloromethane and washed with 2 mol/L HCl. The separated organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and evaporated *in vacuo*. The residue was weighted and the content of polyproline derivative quantified by HPLC. The amount of **CS1** calculated to be bonded in the column was 131.7 µmol CS/g of CSP (considering a MW average of 2123.66 g/mol). This corresponds to an amount of 91.5 µmol of CS in a 10 cm monolithic column.

2.4 Preparation of monolithic CSP-2

A solution of 369.2 mg (0.17 mmol) of **CS2** and 138.0 mg (0.56 mmol) of 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline in 8 mL of anhydrous DMF was prepared. Analogously to that described for **CSP-1**, an aminopropyl-derived column, previously washed with 10 mL of anhydrous DMF (0.5 mL/min), was fluxed with the above-mentioned solution. The procedure was carried out as for **CSP-1**. The amount of **CS2** calculated to be bonded in the column was 91.8 µmol CS/g of CSP (considering a MW average of 2236.23 g/mol). This corresponds to an amount of 57.8 µmol of CS in a 10 cm monolithic column.

2.5 End-capping treatment of CSP-2

CSP-2 was washed with 10 mL of anhydrous toluene at a flow rate of 0.2 mL/min. Subsequently, the column was fluxed with a solution of 800 µL (3.84 mmol) of 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane in 8 mL of toluene at a flow rate of 0.2 mL/min for 8 min. The remaining solution was fluxed through the column at 0.025 mL/min. The temperature was maintained at 40°C. Finally, the column was washed with toluene for 60 min (0.2 mL/min).

3 Results and discussion

Given the outstanding chromatographic properties of monolithic materials such as high efficiency and loadability, we considered the application of substituted polyproline CSs to these chromatographic matrices. In previous studies [20, 21], the chromatographic enantioselective behavior **CS1** and **CS2** (Fig. 1) chemically bonded onto aminopropylated silica bead matrices was described. The polyproline-derived CSPs showed broader enantioselectivity and higher loading

capacity than the corresponding monoproline-derived CSPs in heptane/2-propanol (2-PrOH) and heptane/methyl *t*-butyl ether. These properties were considered interesting from the view of preparative applications. At present, we combined the advantages provided by the polyproline CSs to the features contributed by the monolithic matrix structure and studied two CSPs shown in Fig. 1.

3.1 Effect of derivatization of monolithic columns on efficiency and backpressure

Many authors report on the better efficiencies of monoliths compared to bead-packed columns, in particular at higher flow rates. Several consider that “monolithic columns have an equivalent efficiency of a 3–5 µm particle-packed column of the same length” [22, 23]. Given that the CS is bonded onto a previously existing monolithic rod, to assess the effect that derivatization could have on mobile phase hydrodynamics was considered of interest. Consequently, the plate height of an aminopropylated monolithic column (before the introduction of the CS) and **CSP-1** were evaluated using heptane/2-PrOH (70/30) as mobile phase and 1,3,5-tri-*tert*-butyl benzene as analyte (Fig. 2A). The efficiency of sequential injections of the latter at flow rates ranging from 0.2 to 4 mL/min was determined.

The columns showed a similar pattern. Plate height increased with flow rate as expected. The aminopropyl monolithic column showed the smaller plate height at any flow rate. For example, a plate height of 31 µm was determined at 0.2 mL/min. The *H* value for **CSP-1** was 40 µm at the lowest flow rate (0.2 mL/min), this is 25 000 plates/m. This value increases with the increase in flow rate, being higher than that of the underivatized aminopropylated monolithic column at all instances. Nevertheless, the increase in flow rate did not involve a significant increase in the backpressure of the column. Also *H* does not increase linearly with increasing flow rate. On the contrary, the effect of derivatization seems to be more pronounced at higher flow rates, when the difference between *H* values for the underivatized column and those for **CSP-1** are higher.

It is known that monolithic columns offer a high permeability with the possibility to further increase flow rate without a large increment in backpressure. In order to test the effect of derivatization on this property **CSP-1** and its analogous bead-based counterpart (Fig. 2B) were submitted to increasing flow rates from 0.5 up to 9 mL/min and the resulting backpressure registered. Heptane/2-PrOH mixtures with different content in 2-PrOH were used as mobile phase. Given the different length of the two columns (10 cm for the monolithic **CSP-1** and 15 cm for its bead-based analogue), values determined were normalized to a column length of 15 cm. Mixtures containing a higher percentage of the alcohol modifier led to higher column backpressures due to the higher viscosity of 2-PrOH. However, using the same flow rate and composition, **CSP-1** showed a five times lower column backpressure than its bead-based analogue.

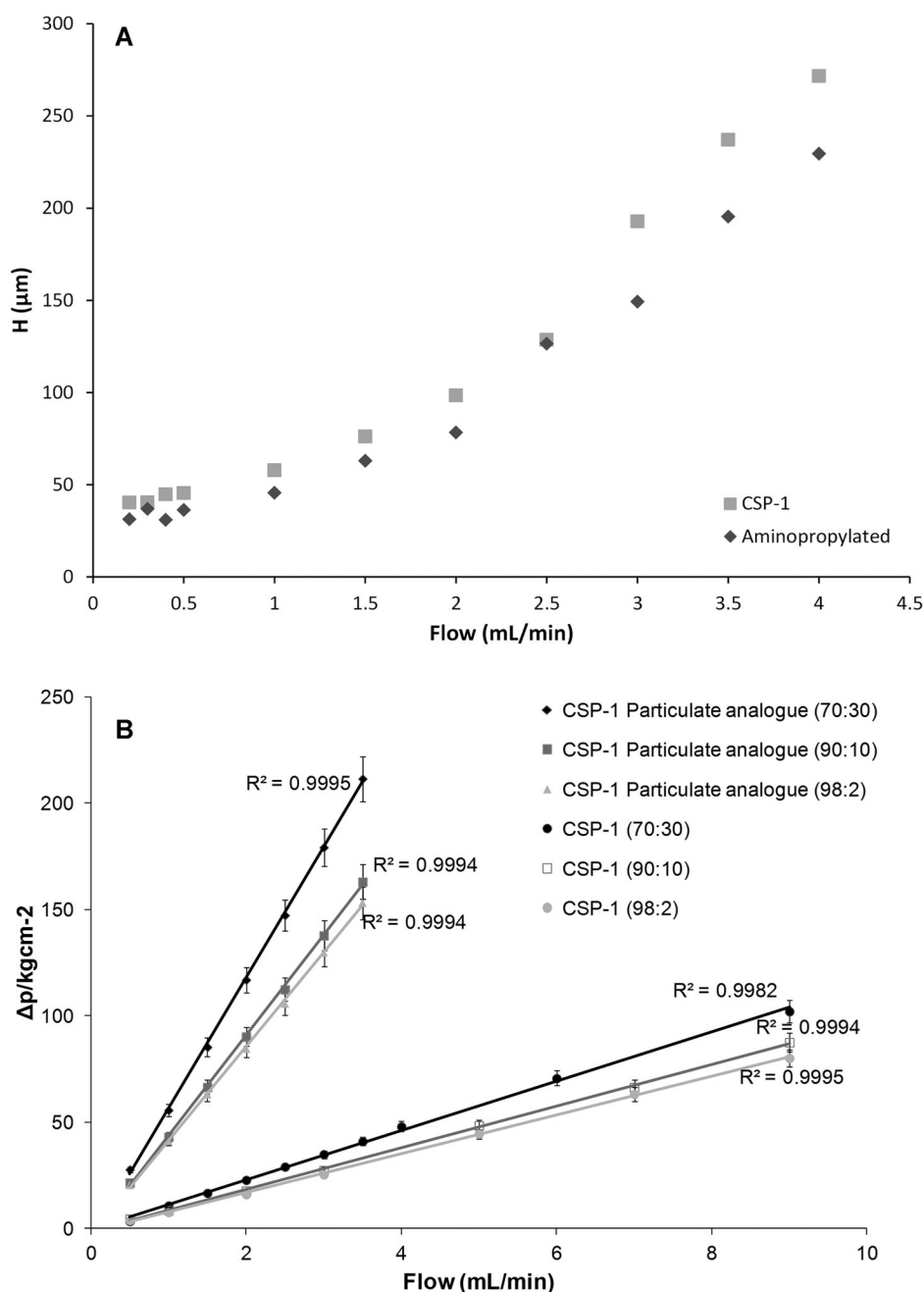


Figure 2. Effect of flow rate on (A) peak efficiency (mobile phase: heptane/2-PrOH, 70:30) and (B) on column backpressure. The pressures were normalized to a column length of 15 cm.

3.2 Polyproline-based monolithic columns performance

Racemic test compounds shown in Fig. 3 were chosen for comparative reasons according to the criteria established in previous studies [20, 21]. Structural diversity with accent in certain chemical characters, such as molecules bearing dinitrobenzoyl groups (1–5, 9, 22), or hydrogen bond donors (1–8, 12, 13, 15, 19–22), or both (1–5, 22), were considered. A summary of the chromatographic behavior of the CSPs related to this series of analytes is shown in Table 1. Regarding the mobile phase, only mixtures of heptane/2-propanol were used.

Chlorinated solvents were avoided because of the restrictions imposed by the PEEK casing of the commercially available monolithic columns. RP conditions were neither used because they are known to reduce drastically the enantioselectivity of the studied CSs [20].

Our CSPs showed two different retention patterns with respect to the analytes considered. High retention factors (k_1) were observed for analytes bearing dinitrobenzoyl groups, which were easily resolved using both CSP-1 and CSP-2. Given the presence of π -donor 3,5-dimethylphenylcarbamate moieties on the CSs, and the π -acceptor groups on the analyte, complimentary π – π

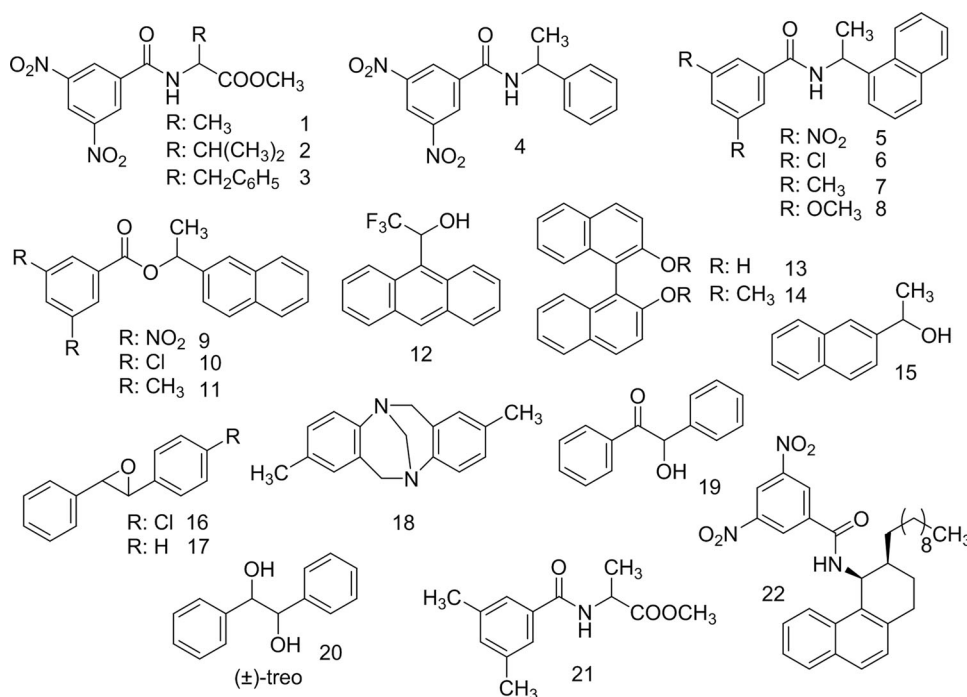


Figure 3. Structures of the racemic test compounds.

interactions between the two species are assumed to play a significant role in the enantiorecognition of such compounds [20, 21, 24]. The remaining analytes were scarcely retained in equivalent conditions and even less retained when the lipophilicity of the mobile phase was increased up to heptane/2-PrOH (98:2).

This observation was attributed to the high amount of organic matter contained into the columns. The density of CS was indirectly estimated to be approximately 100–130 $\mu\text{mol CS/g CSP}$. This value is in the order of five times higher than that calculated formerly for bead-based CSPs [20, 21]. Although the specific surface for the two formats is of the same order of magnitude (300–320 m^2/g , data given by the manufacturers), an easier accessibility of reagents to the functional sites in the monolith may explain this result.

It is worth of noting the difference in derivatization for **CSP-1** (91.5 μmol per column) and **CSP-2** (57.2 μmol per column). This difference may be attributed to the increased steric hindrance of **CS2** with respect to **CS1**, which may make the approach of **CS2** to the silica surface more difficult. The same effect was observed for bead-based matrices. A lower coverage was attained with **CS2** than with **CS1** [21]. Considering the lower derivatization and the lower resolution of racemates tested, **CSP-2** was submitted to an additional end-capping treatment. This process was aimed to control the possible detrimental effect of the unreacted silanol groups on the matrix surface. After end-capping, the increased lipophilicity of **CSP-2** led to a reduced retention for all compounds. Lower retention factors were observed even for those compounds that were only slightly retained before end-capping. This observation reinforces the hypothesis of being the studied CSPs remarkably lipophilized columns. Nevertheless, in

spite of the low retention, enantioselectivity was only slightly improved for **CSP-2** after end-capping. This effect is probably the consequence of the decrease in peak width, which results in an improved resolution.

In spite of the additional end-capping treatment on **CSP-2**, **CSP-1** exhibited higher separation factors (α) and higher resolution (R_s) than the former. For this reason, considering the high derivatization of **CSP-1**, the end-capping treatment was not performed in this column. It is worth noting that, apart from the dinitrobenzoyl-group containing racemates, and in spite of the low retention, compounds bearing an H-bond donor group were resolved on both columns (6–8, 12, 19–21). This observation is consistent with the known significance of H-bonding in recognition by polyproline-derived CSs. Compounds 13 and 14 constitute an exception to this general rule. In this case, 14 has no H-bond donor group and it is partially resolved on **CSP-1**. However, in spite of its high retention, no enantioselectivity is observed for the structurally related compound 13.

To sum up, the difference in enantioselectivity between **CSP-1** and **CSP-2** can be considered merely quantitative, probably based on the different density of CSs bonded on the monolithic aminopropylsilica gel column, a value difficult to determine with accuracy without destroying the column.

When compared to particle-based CSPs [20, 21] (Table 1), higher separation factors were observed for the monolithic columns than for the corresponding bead-based counterpart. The most significant chemical difference between polyproline-derived monolithic and bead-based CSPs containing analogous CSs, is the calculated amount of CS contained into the column (about 11 $\mu\text{mol CS2}$ per column in the **CSP-2** bead-based analogue). This chemical difference,

Table 1. Chromatographic results obtained using heptane/2-PrOH mixtures as mobile phase

Racemic compounds	CSP-1			CSP-2 (after end-capping treatment)			CSP-2 bead-based counterpart		
	$k_1^a)$	α	R_s	$k_1^a)$	α	R_s	$k_1^a)$	α	R_s
1	5.29 (<i>R</i>)	1.13	0.98	3.10 (<i>R</i>)	1.10	0.49	4.14 (<i>R</i>)	1.11	1.01
2	4.65	1.00	–	2.06	1.03	–	2.40 (<i>R</i>)	1.06	0.42
3	10.49 (<i>R</i>)	1.25	1.62	4.08 (<i>R</i>)	1.08	0.46	4.64 (<i>R</i>)	1.08	0.75
4	14.33 ^{b),c)} (<i>R</i>)	2.04	3.87	3.63 (<i>R</i>) ^{e)}	1.42	1.87	3.94 (<i>R</i>)	1.36	3.06
5	4.84 (<i>R</i>)	2.62	4.83	4.59 (<i>R</i>) ^{e)}	1.38	1.61	4.58 (<i>R</i>)	1.45	3.74
6	0.55	2.89	4.81	0.71	2.36	4.26	0.99	1.96	4.21
7	0.72	3.50	5.74	0.93	2.60	3.84	1.37	2.20	5.24
8	2.33	1.68	3.16	1.97	1.88	3.01	2.90	1.68	3.76
9	3.11	1.00	–	1.46 ^{d)}	1.06	0.27	1.87 ^{d)}	1.13	1.08
10	0.09	1.00	–	0.06	1.00	–	0.09	1.00	–
11	0.09	1.00	–	0.09	1.00	–	0.14	1.00	–
12	0.61 (<i>R</i>)	1.22	1.15	0.83 ^{e)}	1.03	–	6.01 ^{d)}	1.04	0.36
13	13.42	1.00	–	5.72	1.00	–	5.03	1.00	–
14	0.51	1.09	0.31	0.24	1.00	–	0.34	1.00	–
15	0.33 (<i>S</i>)	1.13	0.39	0.41	1.00	–	0.71	1.00	–
16	0.18	1.00	–	0.09	1.00	–	0.02	1.00	–
17	0.15	1.00	–	0.10	1.00	–	0.02	1.00	–
18	4.45	1.00	–	0.15	1.00	–	0.40	1.00	–
19	0.91	1.12	0.90	0.69 ^{e)}	1.04	–	1.03	1.00	–
20	0.92	1.57	2.19	1.17	1.29	1.68	2.58	1.14	1.33
21	0.44 (<i>R</i>)	1.59	2.05	0.68 (<i>R</i>)	1.21	1.03	1.26 (<i>R</i>)	1.15	1.09
Mobile phase	Heptane/2-PrOH (70/30) Flow Rate: 0.5 mL/min			Heptane/2-PrOH (90:10) Flow Rate: 1 mL/min			Heptane/2-PrOH (90:10) Flow Rate: 1 mL/min		

a) In parentheses is the absolute configuration of the first eluted enantiomer.

b) Heptane/2-PrOH (90:10).

c) Flow rate: 3 mL/min.

d) Heptane/2-PrOH (98:2).

e) Flow rate: 0.5 mL/min.

together with an easier accessibility of the CS on the monolithic format, may account for the enhanced separation factors.

3.3 Comparative loading ability of particulate and monolithic silica columns

Higher loadability is a very important property when preparative applications are considered. In a former study, the loading capacity of a polyproline-derivative (CS1) was compared to that of the analogous monoproline-derivate [20], both attached to a particle-based stationary phase. The loading ability of the polyproline-derived CSP, considering a similar content of proline units in the two columns, resulted to be five times higher than its single-polyproline counterpart, which is a proof of the intrinsic ability of the polymeric CS.

It is known that the flow characteristics through monolithic beds may contribute to the enhancement of loadability by allowing higher flow rates [7]. Moreover, in spite of a similar specific surface area, monoliths exhibit a higher availability to reagents when compared to particle-based format. This

property has resulted in an increased amount of CS attached to the matrix. The combination of the two features (the possibility to increase flow rate and increased density of CS) may provide higher loading capacity for this kind of separation media.

Consequently, the loading capacity for 5 on CSP-1 was studied by injecting increasing amounts of racemate until $R_s \leq 1$ (Fig. 4). This analyte was chosen because it resulted very well resolved by CS1 when bonded to either monolithic or particle-based format matrices.

The amount of 5 required to attain a touching-band separation ($R_s = 1$) was almost 1 μmol in CSP-1, while only 220 nmol was resolved by its bead-based analogue. The increased loadability can be therefore estimated to be five times higher in the monolithic column in absolute terms. This factor does not correspond to the ratio of CS contained in CSP-1 (91.5 μmol CS in the column) respect to its bead-based counterpart (40.5 μmol CS in the column). Thus, the increase in loadability observed cannot be justified based only on the higher bonding coverage of monolithic columns. The higher accessibility of the analyte to the CS, enabled by the monolithic format, may be suggested as the complementary factor to justify the observed result.

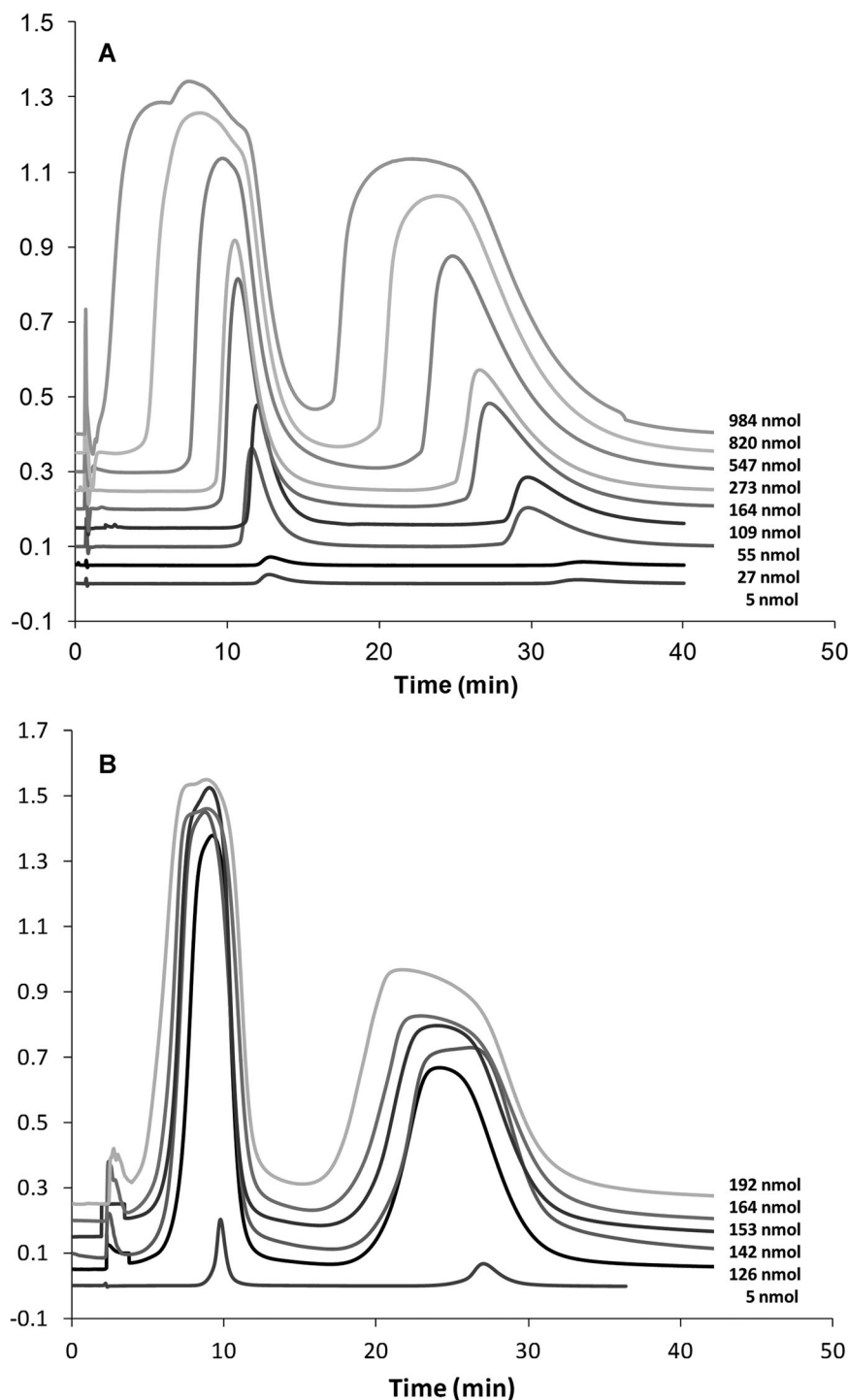


Figure 4. Comparison of the loading capacity for analyte **5** using (A) **CSP-1** (mobile phase: heptane/2-PrOH (90:10), flow rate: 3 mL/min) and using (B) the bead-based counterpart (mobile phase: heptane/2-PrOH (90:10), flow rate: 1 mL/min). UV detection at 226 nm.

3.4 Effects of increasing flow rates on monolithic CSP-1

Furthermore, as previously mentioned, the most striking advantage that monolithic materials offer over bead-based materials are the larger porosities, resulting in high permeability, and large number of theoretical plates per pressure drop unit [25]. The remarkable enantioselectivities and high reten-

tions observed for **CSP-1** permit in most cases to increase the flow rate from 1 to 3 mL/min, thus reducing analysis time. However, in order to evaluate the effect of a considerable increase in flow rate on resolution, the racemic Welk-O analogue **22** was injected at flow rates ranging from 2 to 9 mL/min (Fig. 5). This produced an increase in the column backpressure of only 6.5 MPa (from 2.0 to 8.5 MPa), while the analysis time was reduced over four times (from 40 to

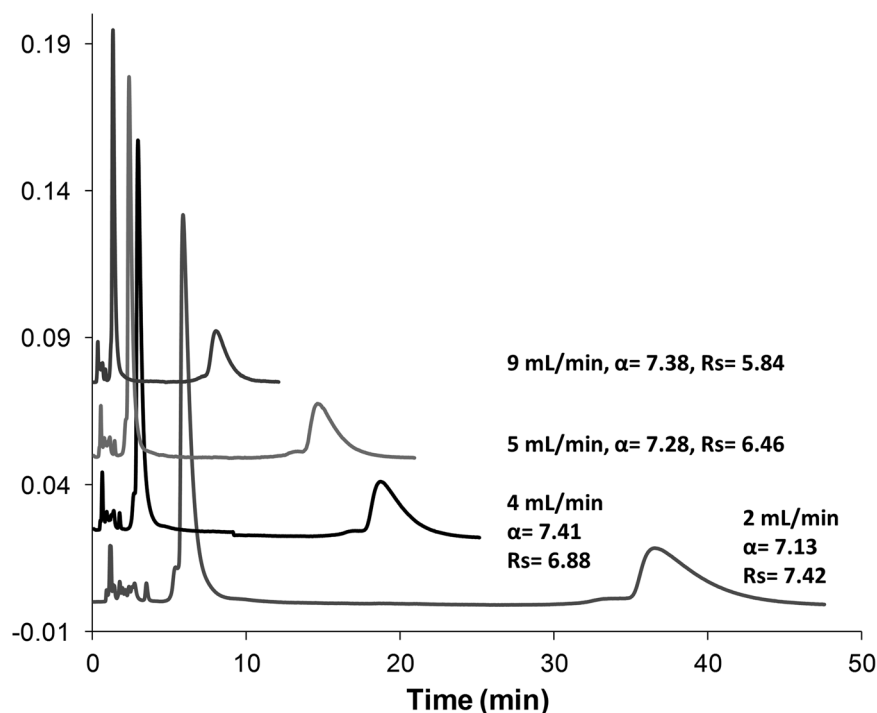


Figure 5. Effect of the increase in flow rate on the enantioselectivity and resolution of **22** using **CSP-1** (heptane/2-PrOH, 90:10). UV detection at 254 nm.

10 min). Nevertheless, the separation factor (α) remained constant and the resolution underwent an only slight decrease. Although the increase in HETP produced by the increment of flow rate should effectively reduce resolution, the decrease in retention time, produced by the same increment of flow rate, reduces diffusion, and therefore results in more efficient peaks. This second effect compensates the former. Consequently, these materials can be considered suitable for high-throughput working mode given the reduction in analysis time when flow rate is increased.

4 Concluding remarks

In spite of similar specific surface, monolithic silica matrices permit the introduction of higher amounts of polyproline-based CSs onto the CSP than their particle-based counterparts. This increased CS density leads to higher retention times, greater separation factors, and a broader application domain for monolithic columns. Additionally, the structural difference between the studied CSs also influences their bonding to the silica gel surface thus affecting retention time for the two columns tested. However, when using heptane/2-PrOH mixtures as mobile phase, most analytes bearing an H-bond donor group are resolved by **CSP-1** and **CSP-2**.

The higher CS surface coverage of monolithic columns results in an increased loadability. Sample loadings up to five times higher are observed for monolithic columns compared to their bead-based CSP counterparts. However, the improved accessibility of the CS to the analyte when bonded to a monolithic matrix has a significant contribution to the enhanced loadability observed. This property makes polyproline-derived

monolithic CSPs suitable candidates for preparative purposes.

Considering analytical applications, it is worth noting that the increase in flow rate permits the reduction of analysis time with only a minor effect on resolution. This feature makes this novel kind of monolithic CSPs adequate candidates for the application to high-throughput approaches.

Funding from Ministerio de Educación y Ciencia and European Regional Development Fund (ERDF) (project number CTQ 2006-03378/PPQ) is gratefully acknowledged. R. Sancho and A. Novell acknowledge the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) of the Generalitat de Catalunya for predoctoral fellowships. R. S. also thanks the Generalitat de Catalunya for a grant for stays abroad (2006 BE-2-00230). Part of the experimental work was performed at the Molecular Foundry, Lawrence Berkeley National Laboratory and supported by the Office of Science, Office of Basic Energy Sciences, Scientific User Facilities Division of the US Department of Energy, under Contract no. DE-AC02-05CH11231.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Svec, F., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 729–745.
- [2] Xu, Y., Cao, Q., Svec, F., Fréchet, J. M. J., *Anal. Chem.* 2010, 82, 3352–3358.
- [3] Kato, M., Sakai-Kato, K., Toyooka, T., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 1893–1908.
- [4] Wistuba, D., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 941–952.
- [5] Chankvetadze, B., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 305–314.

- [6] Chankvetadze, B., Yamamoto, C., Okamoto, Y., *Chem. Lett.* 2003, 32, 850–851.
- [7] Chankvetadze, B., Ikai, T., Yamamoto, C., Okamoto, Y., *J. Chromatogr. A* 2004, 1042, 55–60.
- [8] Lubda, D., Lindner, W., *J. Chromatogr. A* 2004, 1036, 135–143.
- [9] Lubda, D., Cabrera, K., Nakanishi, K., Lindner, W., *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 377, 892–901.
- [10] Cavazzini, A., Pasti, L., Massi, A., Marchetti, N., Dondi, F., *Anal. Chim. Acta* 2011, 706, 205–22.
- [11] Huang, J., Zhang, P., Chen, H., Li, T., *Anal. Chem.* 2005, 77, 3301–3308.
- [12] Huang, J., Chen, H., Li, T., *J. Chromatogr. A* 2006, 1113, 109–115.
- [13] Huang, J., Chen, H., Zhang, P., Li, T., *J. Chromatogr. A* 2006, 1109, 307–311.
- [14] Lao, W., Gan, J., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 2359–2368.
- [15] Lao, W., Gan, J., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 5020–5029.
- [16] Lao, W., Gan, J., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 6545–6554.
- [17] Lao, W., Gan, J., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 3052–3059.
- [18] Ashtari, M., Cann, N. M., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 6331–6347.
- [19] Ashtari, M., Cann, N. M., *J. Chromatogr. A* 2012, 1265, 70–87.
- [20] Sancho, R., Pérez, A. M., Minguillón, C., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 905–914.
- [21] Sancho, R., Minguillón, C., *J. Chromatogr. B* 2008, 875, 93–101.
- [22] Guiochon, G., *J. Chromatogr. A* 2007, 1168, 101–168.
- [23] Miyabe, K., Guiochon, G., *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 853–873.
- [24] Novell, A., Minguillón, C., *J. Chromatogr. A* 2014, doi:10.1016/j.chroma.2014.05.020.
- [25] Unger, K. K., Skudas, R., Schulte, M. M., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 393–415.

4.3. Columnes monolítiques de sílice covalentment enllaçades a un SQ d'octaprolina. Estudi de la dependència entre el comportament cromatogràfic i el grau de derivatització i comparació amb la columna particulada anàloga.

4.3.1. Precedents

En l'estudi anterior [114] es va demostrar la clara millora en els paràmetres cromatogràfics resultants de la utilització d'un SQ de tipus oligoprolina substituït sobre una matriu cromatogràfica de tipus monolític respecte a la corresponent FEQ particulada. Les noves FEQs monolítiques preparades també ofereixen una major capacitat enantioselectiva i un espectre d'aplicació més ampli. Altres avantatges d'aquests nous materials, tal i com un significatiu increment en la capacitat de càrrega i el manteniment de la resolució al augmentar el flux de la fase mòbil, també van quedar palesos en el mateix estudi [114].

Totes aquestes característiques es van atribuir a l'ús de monòlits com a matrius cromatogràfiques. A més a més, malgrat que les fases particulades i les monolítiques posseeixen una superfície específica similar, aquestes darreres permeten un major ancoratge de SQ en la matriu cromatogràfica, és a dir, el contingut de SQ que contenen és més elevat. Per tant, sembla que no només la naturalesa de la matriu monolítica és la responsable del comportament cromatogràfic millorat, sinó que el major grau de derivatització també juga un paper important en aquest aspecte.

En aquest context, l'objectiu principal d'aquest estudi va ser determinar si les millores del comportament cromatogràfic observades en les FEQs monolítiques són atribuïbles únicament al major grau de derivatització que permet aquest tipus de matriu o bé si existeix un efecte, intrínsec al tipus de matriu, que determinaria la disponibilitat i accessibilitat del SQ sobre la matriu per part de l'analit.

4.3.2. Desenvolupament i Conclusions

Per tal de dur a terme aquest estudi, es van preparar tres noves columnes quirals amb el **SQ5** tipus octaprolina: i) **FEQ-8**, monolítica amb el SQ enllaçat al suport cromatogràfic a través d'un enllaç amida, ii) **FEQ-5**, de partícules de sílice, amb el SQ enllaçat també mitjançant un enllaç amida i iii) **FEQ-9**, monolítica, però sense el grup aminopropil sobre la sílice, i per tant el SQ està unit a la matriu cromatogràfica a través d'un enllaç de tipus ester entre aquest i els grups silanol de la superfície (Figura 4.3).

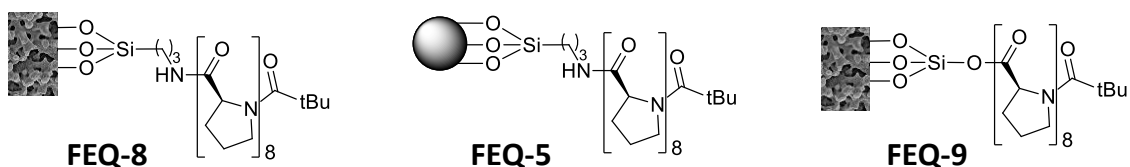


Figura 4.3. Fases estacionàries quirals emprades en aquest estudi [115]. **FEQ-8** correspon a **CSP-1** en l'article. **FEQ-5** correspon a **CSP-2** i **FEQ-9** correspon a **CSP-3**.

La preparació de **FEQ-8** es va dur a terme en diferents etapes de derivatització. De tal manera que, després de cada etapa de derivatització parcial es procedia a avaluar cromatogràficament la columna. Els assaigs cromatogràfics es van fer amb una sèrie de compostos racèmics estructuralment molt relacionats. A partir dels estudis cromatogràfics realitzats durant la preparació de la **FEQ-8**, es va observar que després de cada etapa de derivatització es produïa un augment en l'enantioselectivitat de la columna. Es va demostrar per tant que existeix una relació directament proporcional entre el contingut de SQ de la columna i l'enantioselectivitat d'aquesta. L'eficiència també millora significativament entre la columna menys derivatitzada i la columna que ho està més, com ho fa també la resolució.

En aquest estudi es va fer palès que **FEQ-8**, que uneix el millor dels selectors quirals estudiats amb la matriu monolítica en una única columna, es la FEQ que exhibeix una enantioselectivitat més elevada, una millor resolució, un ventall d'aplicació més ampli, així com una major capacitat de càrrega entre totes les estudiades en la present tesi doctoral. Tant és així, que la **FEQ-8** és capaç de resoldre analits que no contenen grups donadors d'enllaços d'hidrogen, fet que no s'observa per la seva anàloga particulada (**FEQ-5**).

Finalment, en l'estudi també es demostra que les millores tant en l'enantioselectivitat com en la capacitat de càrrega no només són atribuïbles a una major quantitat de SQ contingut dins les columnes monolítiques. De fet, una columna monolítica (**FEQ-9**) amb una quantitat similar de SQ a la columna particulada **FEQ-5** exhibeix valors tant d'enantioselectivitat com de capacitat de càrrega molt superiors a la darrera, la qual cosa ens indica l'existència d'un efecte de disponibilitat o accessibilitat del SQ en la matriu monolítica que no actuaria en la matriu particulada.

Article III [115]

Arnau NOVELL, Cristina MINGUILLÓN*, “Monolithic silica columns with covalently attached octapoline chiral selector. Dependence of performance on derivatization degree and comparison with a bead-based analogue”, *Journal of Chromatography A*, 1384 (2015) 124-132

Índex d'Impacte (JCR 2014): **4,169**

Posició en l'àrea de Química Analítica (JCR 2014): **6/74**



Monolithic silica columns with covalently attached octaproline chiral selector. Dependence of performance on derivatization degree and comparison with a bead-based analogue



A. Novell^{a,b}, C. Minguillón^{a,b,*}

^a Campus de l'Alimentació de Torribera, University of Barcelona, Prat de la Riba 171, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain

^b Laboratori de Química Farmacèutica, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2014

Received in revised form 16 January 2015

Accepted 19 January 2015

Available online 28 January 2015

Keywords:

Poly-L-proline oligomers

Silica monoliths

Loadability

Enantioseparation

Chiral stationary phases

ABSTRACT

A monolithic silica gel chromatographic matrix was derivatized repetitively with an octaproline-derived chiral selector (CS). The increasingly derivatized column was tested after each derivatization reaction. The enantioseparation ability, resolution and efficiency were found to depend on the content of CS attained after each reaction. Moreover, enantioselectivity and performance of the column with the highest CS coverage were compared to those of a bead-based chiral stationary phase (CSP) counterpart. The octaproline-derivatized monolithic column demonstrated increased enantioseparation factors, resolution and broader applicability than the particle-based column. Finally, the loading capacity of the CSPs was also examined. The monolithic octaproline-derived column permits the separation of 3–20 times higher molar amounts of the tested analytes (depending on the compound considered) than the particle-based counterpart. The enhanced capabilities of the derivatized monolithic column with respect to that of a bead-based counterpart cannot be explained only on the basis of an increased CS coverage. The involvement of an effect produced by the chromatographic silica support structure in the obtained results is discussed.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

As a result of the increasing demand of single enantiomers, chiral stationary phases (CSPs) have become a fundamental tool in the analysis and purification of this kind of isomers [1]. One of the most recent discoveries in enantioselective chromatography is the outstanding and, somehow, unforeseen enantioselectivity of polyproline-derived chiral selectors (CSs) [2–5]. Oligoproline-derived CSPs share some features in common with brush-type CSPs. The most remarkable is the relative low-molecular weight of the chiral selector (CS). However, oligoproline-based CSPs show a higher selectivity and a broader application domain than most brush-type CSPs [3]. These structures are considered to constitute a new class of peptide-based CSs [2]. Li and co-workers were the first authors to apply them in liquid chromatography CSPs [3–5].

* Corresponding author at: Campus de l'Alimentació de Torribera, University of Barcelona, Verdaguier Building, office N. 12, Prat de la Riba 171, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 403 37 87.

E-mail address: cminguillon@ub.edu (C. Minguillón).

Our group was also interested in the enantioselection ability of this type of CSs. In previous studies, 3,5-dimethylphenylcarbamoyl-substituted oligoproline-derived bead-based CSPs were prepared [6,7]. A strong dependence of enantioselectivity on the type of mobile phase used was detected at this point. Subsequently, the enantioselectivity and performance of a non-substituted octaproline-derived particle-based CSP [8] was compared to that containing the substituted CS [6] using different mobile phases. The significance of CS conformation as well as the important role of H-bonding on enantioselectivity was confirmed. Most tested analytes bearing at least one H-bond donor group were better resolved on the non-substituted oligoproline-derived CSP. This enhanced enantioselectivity was attributed to the improved availability of the carbonyl groups on the octaproline CS due to the lack of the voluminous 3,5-dimethylphenylcarbamate groups. In parallel, poly-(4R)-(3,5-dimethylphenylaminocarbonyloxy)-L-proline CS was fixed to monolithic silica gel and the performance of the resulting CSP tested [9].

In situ chiral modification of silica monoliths has been already applied to the preparation of monolithic CSPs [10,11] as this format has acquired a significant relevance in high performance liquid

chromatography (HPLC) [9,12], capillary chromatography [13–15] and capillary electrochromatography (CEC) [16–19]. Monolithic matrices offer some advantages over bead-based supports. Among them the ease of preparation, high reproducibility, versatile surface modification, high permeability and good peak capacity [12,20] make them a good alternative to more classical bead-format matrices. Moreover, backpressures in monolithic beds can be maintained low even at high flow rates. In such conditions separation values are maintained while reducing retention, and consequently providing high-throughput and high productivity [21].

When the above mentioned substituted oligoproline CS was bonded to monolithic silica rods an improved chromatographic performance was obtained [9]. In spite of similar specific surface, monolithic silica permits a higher coverage of polyproline-based CSs onto the matrix than their particle-based counterparts. The resulting columns showed higher retention times, greater separation factors and a broader application domain than their bead-based counterparts.

On the basis of these observations, the aim of this study is to determine if the observed chromatographic improvement is a direct consequence of the increase of CS density on the monolithic with respect to the bead format and/or the consequence of an improved accessibility of the CS provided by the structure of the matrix. The evaluation of the influence of the degree of derivatization on the performance of monolithic columns will provide us with some insights on the specific role of the matrix format in this case. Given the higher enantioselectivity of non-substituted-oligoprolines over substituted-oligoprolines and the higher derivatization of the CSP when the CS lacks of bulky dimethylphenylcarbamate groups, a non-substituted-octaproline derivative was the CS chosen for this purpose (Fig. 1).

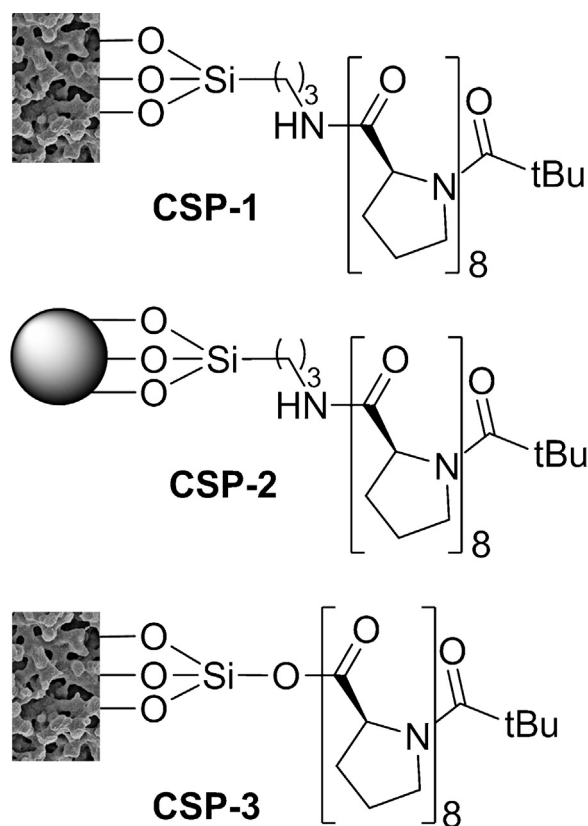


Fig. 1. Chemical structures of the CSPs in the study.

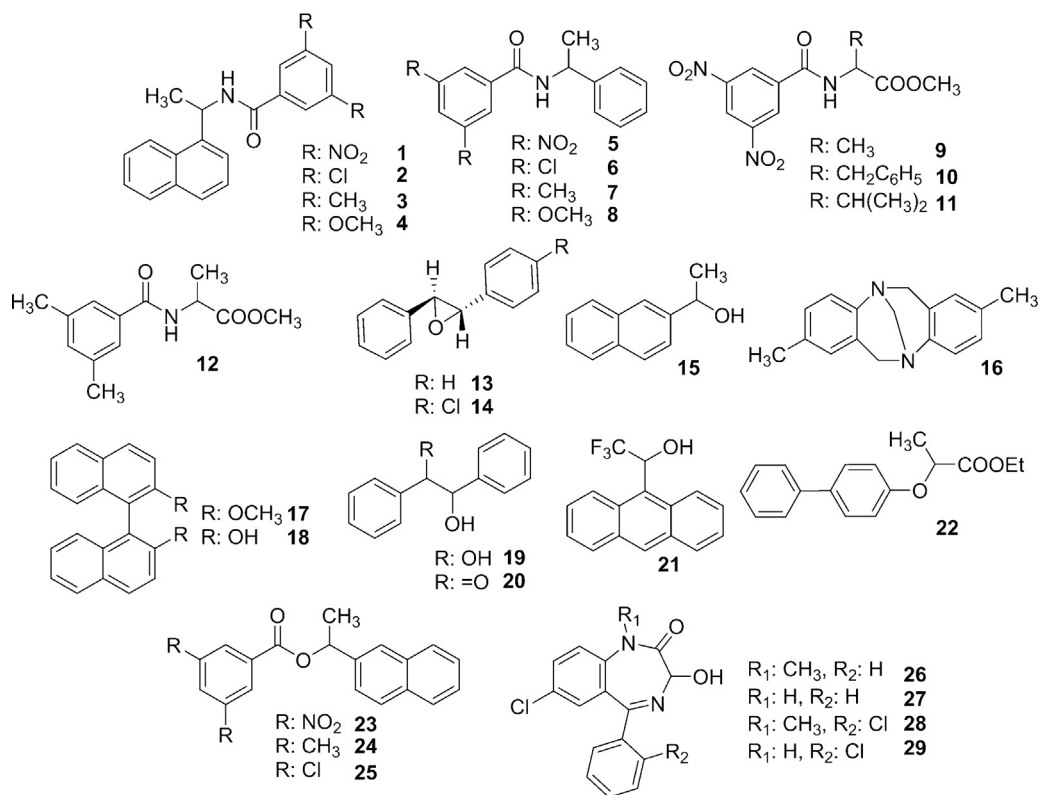


Fig. 2. Structures of the test compounds in the study.

Table 1
Content of CS in the CSPs.

CSP	CS weight (mg)	$\mu\text{mol CS/column}$	$\mu\text{mol CS/g CSP}$	$\mu\text{mol CS/g silica}$
CSP-1a	162.0	184.41	215.51	368.82
CSP-1b	326.4	412.53	399.70	825.06
CSP-1c	395.1	449.75	411.93	899.50
CSP-2	165.7	188.57	157.14	215.43
CSP-3	227.5	265.46	362.05	530.92

Table 2
Chromatographic results obtained for **CSP-1c** (monolithic) and its bead-based counterpart (**CSP-2**).

Racemic compounds	Mobile phase	CSP-1c			CSP-2		
		k_1^a	α	Rs	k_1^a	α	Rs
1	90:10	3.61	2.47	9.38	2.41 (R)	1.65	1.87
2	90:10	1.22	2.61	10.72	1.13	1.86	3.16
3	90:10	1.33	3.31	11.92	1.72	1.98	3.70
4	90:10	2.98	3.51	12.66	2.57	2.31	4.61
5	95:5	7.34 (R)	1.45	4.24	5.43 (R)	1.24	1.44
6	95:5	2.12 (R)	1.45	4.67	1.93 (R)	1.19	1.37
7	95:5	2.63 (R)	1.46	4.83	2.86 (R)	1.15	0.89
8	95:5	5.42 (R)	1.13	4.24	4.18 (R)	1.19	1.31
9	95:5	5.72	1.15	1.54	11.47 ^b (R)	1.11	0.77
10	95:5	5.05	1.13	1.52	8.95 ^b (R)	1.11	0.96
11	95:5	2.66	1.16	1.41	4.46 ^b (R)	1.12	1.01
12	98:2	2.97	1.17	1.28	3.92 ^b (R)	1.12	0.91
13	99:1	0.25	1.42	1.68	0.25	1.00	–
14	99:1	0.26	1.43	1.71	0.25	1.00	–
15	99:1	9.51	1.10	0.53	9.63	1.00	–
16	99:1	0.26	1.00	–	1.82	1.00	–
17	99:1	0.93	1.12	–	1.08	1.00	–
18	70:30	9.39	1.40	3.24	9.63 ^c	1.15	0.77
19	95:5	4.48	1.18	1.70	4.51	1.11	0.62
20	99:1	4.23	1.13	1.11	6.84	1.00	–
21	90:10	4.34 (R)	1.72	8.26	2.35 (R)	1.47	3.44
22	99.5:0.5	0.63	1.05	–	0.55	1.00	–
23	99:1	1.00	1.06	–	0.98	1.00	–
24	99:1	0.40	1.00	–	0.32	1.00	–
25	99:1	0.23	1.00	–	0.17	1.00	–
26	95:5	4.88	1.00	–	2.30 ^c	1.00	–
27	90:10	8.11	1.00	–	24.97	1.00	–
28	95:5	5.67	1.09	0.93	8.15 ^c	1.00	–
29	95:5	15.63	1.07	0.71	12.35 ^c	1.00	–

^a In parentheses the absolute configuration of the first eluted enantiomer.^b Mobile phase: heptane/2-PrOH (98:2).^c Mobile phase: heptane/2-PrOH (90:10).

2. Experimental

2.1. General supplies and equipment

Monolithic silica gel columns (Onyx™, 100 mm × 4.6 mm) were purchased from Phenomenex (Torrance, CA, USA). 3-Aminopropyltriethoxysilane was supplied by Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Solvents were provided by Panreac (Barcelona, Spain).

A Fusion 200 Classic syringe pump from Chemyx (Stafford, TX, USA) and a Büchi 461 water bath from Büchi Labortechnik (Flawil, Switzerland) were used in column derivatization. The chromatographic assays were carried out on a Waters HPLC system (Milford,

MA, USA) consisting of a 1525 binary HPLC pump, a 717 autosampler and equipped with a 2467 dual λ UV Absorbance Detector.

The chromatographic results were obtained using heptane/2-propanol (2-PrOH) mixtures as mobile phase. Retention factor (k) was calculated as $(t_r - t_0)/t_0$ being t_r the retention time and t_0 the void time. The enantioseparation factor (α) was calculated as the ratio of the retention factors for the two enantiomers. Resolution was calculated as $2 \cdot (t_2 - t_1)/(\omega_2 + \omega_1)$, where ω_i is the peak width at the baseline. The void time (t_0) was determined with 1,3,5-tri-*tert*-butylbenzene. The usual concentration of the analyte samples (Fig. 2) was 1 mg/mL and the volume of injection 10 μL . The elution order was determined when possible using samples enriched in one of the two enantiomers of known absolute configuration.

Table 3
Chromatographic results for monolithic and bead-based CSPs (mobile phase: heptane/2-PrOH (90:10)).

Racemic compounds	CSP-1a			CSP-2			CSP-3		
	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs	k_1	α	Rs
1	1.82	1.20	1.06	2.41	1.65	1.87	1.11	2.19	5.16
2	0.49	1.29	0.84	1.13	1.86	3.16	0.52	3.04	5.72
3	1.02	1.24	1.42	1.72	1.98	3.70	0.80	3.01	5.22
4	1.69	1.37	2.16	2.57	2.31	4.61	1.65	3.87	7.36

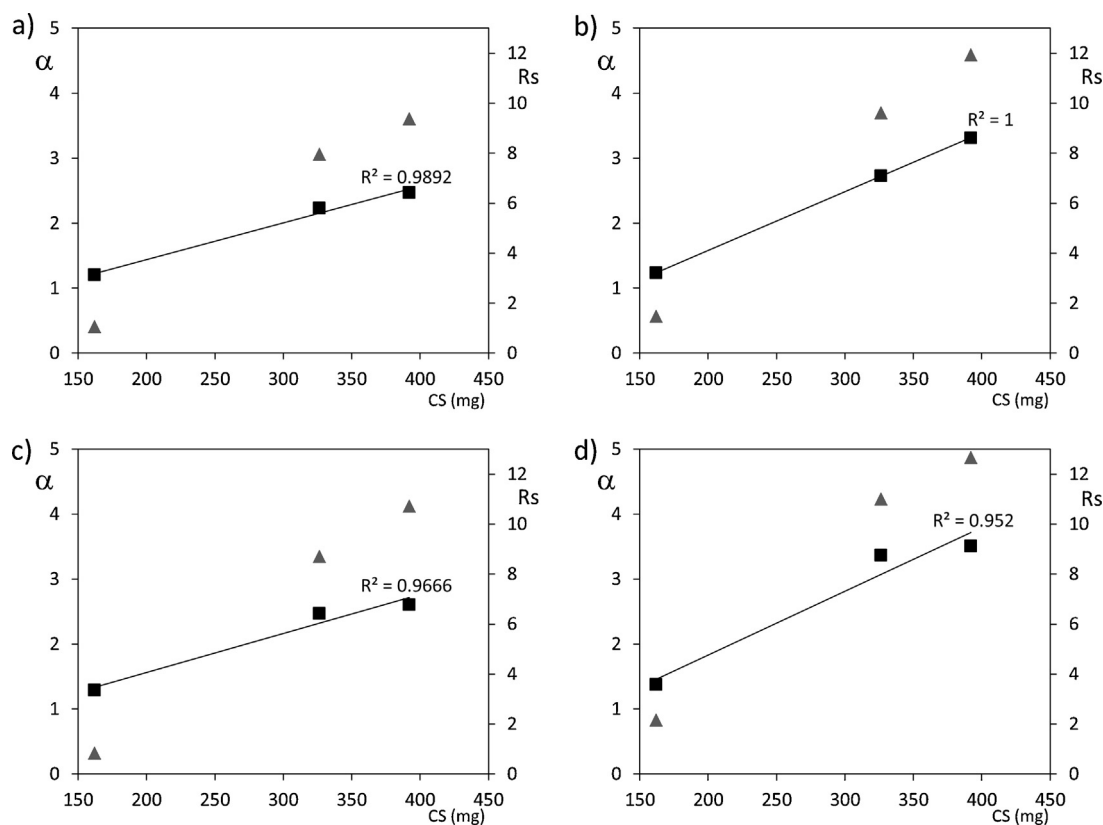


Fig. 3. Dependence of enantioseparation factor, α (■) and resolution, R_s (▲) on CS content (CSP-1a–c). (Enantioseparation factor, left vertical axis; resolution, right vertical axis.) Analytes: (a) 1; (b) 3; (c) 2; (d) 4. Chromatographic conditions: mobile phase, heptane/2-PrOH (90:10); flow rate, 1 mL/min.

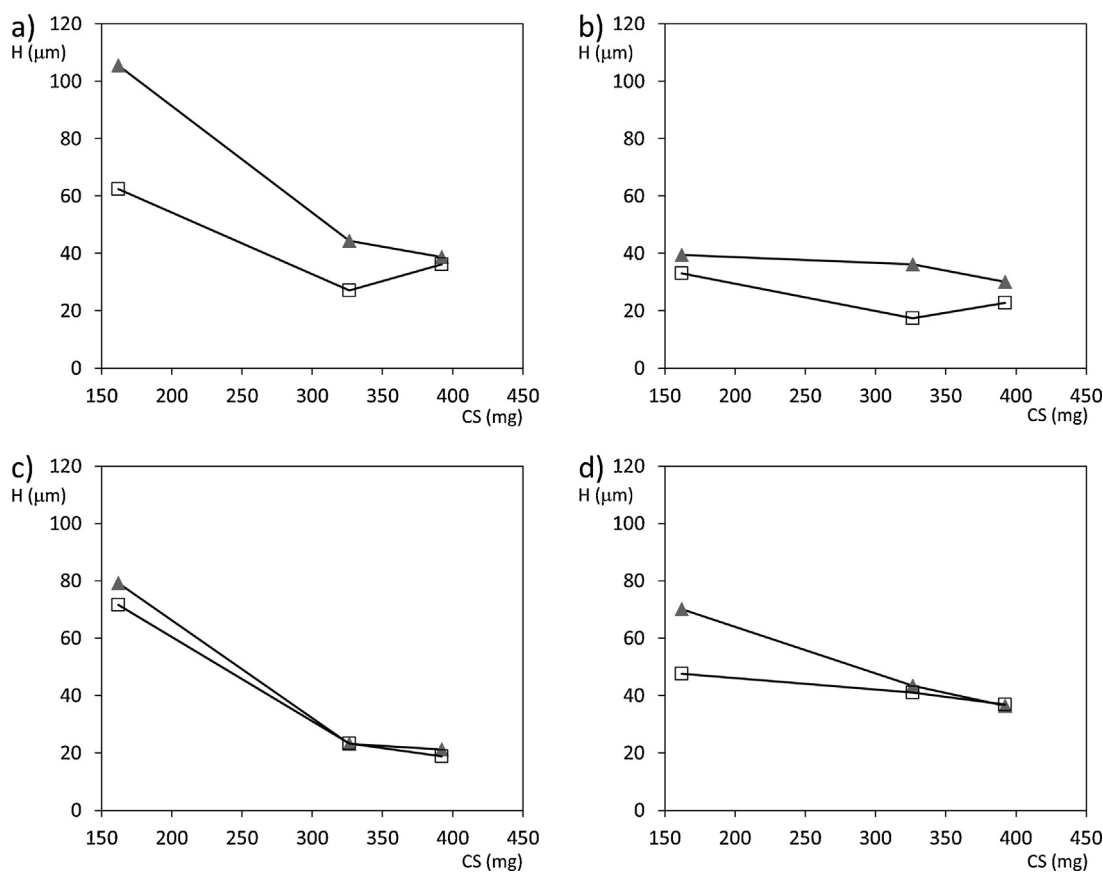


Fig. 4. Dependence of plate height (H) on CS content (CSP-1a–c). (First eluted enantiomer, □; second eluted enantiomer, ▲). Analytes: (a) 1; (b) 3; (c) 2; (d) 4. Chromatographic conditions: mobile phase, heptane/2-PrOH (90:10); flow rate, 1 mL/min.

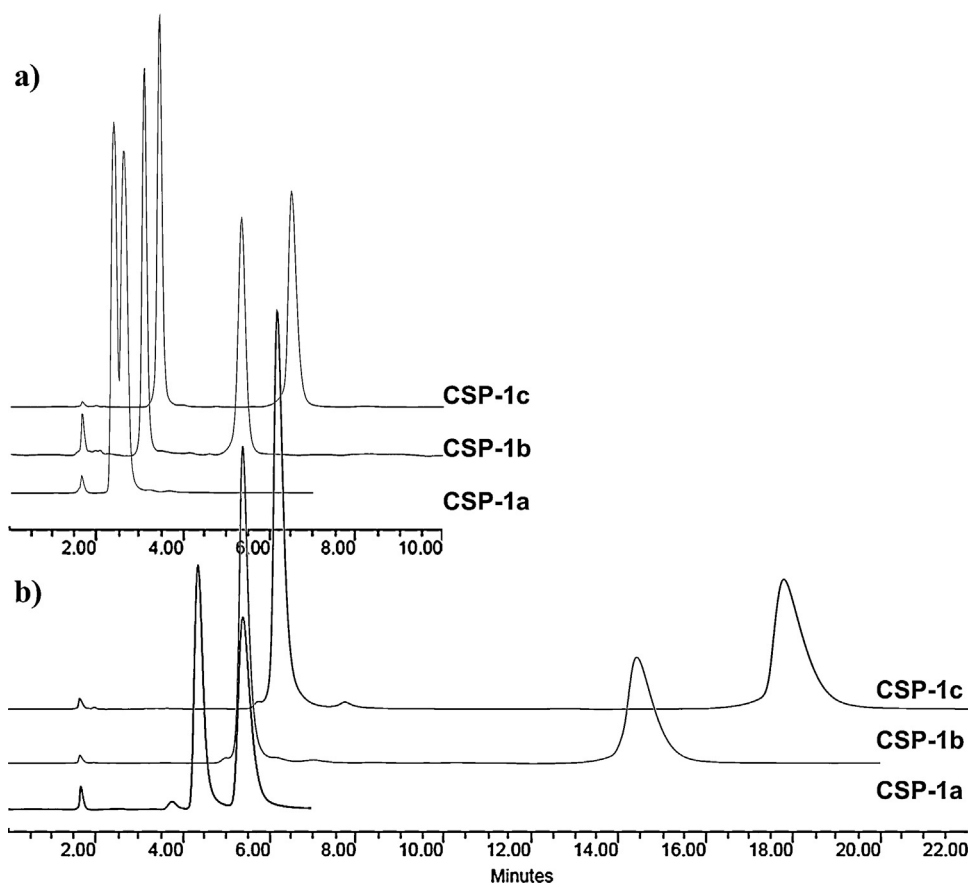


Fig. 5. Chromatographic enantioseparation of (a) **2** and (b) **4** on **CSP-1** containing increasing amounts of CS (**CSP-1a–c**). Mobile phase: heptane/2-PrOH (90:10).

Octapropylene CS was synthesized and characterized by MALDI-TOF MS following the described procedure [8]. The degree of CS immobilized into the column was carefully quantified by weighing the dried column at each derivatization step.

2.2. Preparation of aminopropyl-modified monolithic silica columns

An *in situ* derivatization procedure was followed for the preparation of the modified monolithic silica matrices from commercial columns [22]. A monolithic silica column was washed with 20 mL of hexane at a flow rate of 0.2 mL/min before chemical modification. Subsequently, the column was fluxed with 20 mL of anhydrous toluene at a flow rate of 0.1 mL/min. A solution (10 mL) of 1 mL of 3-aminopropyltriethoxysilane and 0.05 mL of dry pyridine in toluene was fluxed through the column at a flow rate of 0.025 mL/min. Temperature was maintained at 45 °C using a water bath in which the column was immersed. The resulting aminopropyl silica monolith was washed at 45 °C with 50 mL of toluene at a flow rate of 0.1 mL/min. The system was allowed to cool at room temperature for the last 30 min, while fluxed at 1 mL/min with hexane. The resulting aminopropyl-modified column was firstly dried with compressed air and subsequently stored overnight at 60 °C. The column was weighed at this step and the amount of aminopropyl groups attached calculated (197.0 mg; 3.39 mmol of aminopropyl groups).

2.3. Preparation of monolithic CSPs

A solution of 497.2 mg (0.57 mmol) of the CS and 296.0 mg (1.20 mmol) of 2-ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydroquinoline

(EEDQ) in 15 mL of anhydrous dichloromethane (DCM) was prepared. The aminopropyl-column was firstly fluxed with the mentioned solution at a flow rate of 0.5 mL/min for 3 min, and after at a flow rate of 0.025 mL/min. Temperature was maintained at 45 °C and the column was allowed to react overnight. The column was sequentially washed with 30 mL of DCM at a flow rate of 0.3 mL/min, 10 mL of 2-PrOH at 0.05 mL/min and with 30 mL of hexane using a 0.3 mL/min flow rate. The resulting modified column was firstly dried with compressed air and then stored overnight in an oven at 60 °C. The column was weighed and chromatographically evaluated (**CSP-1a**). The derivatization reaction and the subsequent drying, weighing and chromatographic test of the obtained derivatized column, were carried out for two additional times (**CSP-1b** and **CSP-1c**, respectively). The flow direction through the column was inverted for derivatization at each cycle.

2.4. Preparation of bead-based CSP-2

CSP-2 was prepared as previously described [8]. Thus, to a solution of CS (400 mg, 0.45 mmol) in 40 mL of DCM, EEDQ (240 mg, 0.94 mmol) and γ -aminopropylsilica gel (2 g), were added. The suspension was allowed to react overnight at room temperature. The resulting bonded silica gel was collected by filtration, washed with DCM and toluene. The solid material was end-capped in toluene with 1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane (HMDS) (1 h at reflux temperature). The resulting modified silica gel was collected by filtration, washed with toluene, DCM, ethanol (EtOH) and water until neutral washing liquors were obtained, EtOH, acetone and diethyl ether, and dried in vacuum at room temperature.

The content of CS in the columns used in the study (Fig. 1) is shown in Table 1.

3. Results and discussion

When an oligopeptide CS, having 3,5-dimethylphenylcarbamate residues on each proline unit, was bonded to a monolithic silica rod an improved chromatographic performance regarding the analogous bead-based counterpart was observed. The new materials showed higher enantioselectivity, broader application domain and higher loading capacity than the bead-based counterpart [9]. Moreover, resolution was maintained when flow rates up to 9 mL/min were applied [9].

These improved features could be mainly attributed to two different factors: (i) the increased amount of CS contained into the monolithic column and, (ii) the easier accessibility of the analyte to the CS which is produced by the format of the chromatographic matrix. That is, the matrix format provides a more reactive surface onto which the CS is more easily bonded. Moreover, the monolithic structure of the matrix may supply an additional factor by making more available the CS to the analyte, thereby contributing to the observed improvements. To evaluate the importance of the two factors on the resulting performance of the monolithic-based stationary phases, CSPs with different degree of derivatization were tested and compared.

3.1. Dependence of chromatographic performance on the derivatization degree

CSP-1a–c were evaluated using four racemic compounds belonging to the same structural series (**1–4**, Fig. 2). Unexpectedly, the higher organic content in the column produced only a slight increase in the retention time for all the analytes. After total derivatization (**CSP-1c**), the amount of peptide linked is clearly higher than that anchored to the same monolithic column containing a substituted-oligoproline (91.5 μmol for **CSP-1** in [9]). This was attributed to a longer derivatization reaction time for the former and also to a higher reactivity of the CS towards the reacting aminopropyl groups on the matrix surface as a result of the absence of the substituent.

The increased binding of the CS onto the CSP also affected enantioselectivity and performance of **CSP-1a–c** (Fig. 3). Thus, the average of the separation factors for the mentioned compounds after the third derivatization round (**CSP-1c**) is 2.3 times higher than that corresponding to the evaluation of the first derivatization (**CSP-1a**). This closely corresponds to the CS ratio between **CSP-1c** and **CSP-1a**. That is, an almost direct linear relationship seems to exist between enantioselectivity and the amount of the CS bonded on the silica matrix for the monolithic format.

Regarding efficiency, although the height of theoretical plate (*H*) depends strongly on the considered analyte, a noteworthy decrease was observed with increasing derivatization. In all cases, *H* values obtained with **CSP-1a** were higher given the presence of unreacted aminopropyl groups on the monolithic surface. These groups may interact in an unspecific way by producing a peak broadening. The effect diminishes with derivatization producing an important reduction in *H*. It is worth noting that the decrease in *H* is more pronounced for compounds **1** and **2**, bearing π -acceptor groups, than for **3** and **4**, with π -donor groups. Nevertheless, a significant difference was also observed in *H* values for **CSP-1c** for the compounds considered. Thus, **2** and **3** produced more efficient peaks than **1** and **4**. When retention time for these compounds is considered, kinetic effects and a higher non-selective solute–CSP interaction can be claimed in the production of broader peaks for the latter (Figs. 4 and 5).

When resolution was evaluated on the view of CS content, values follow a non-linear relationship resulting from the additional effect of, at least, two factors, the increased enantioselectivity (Fig. 3) and

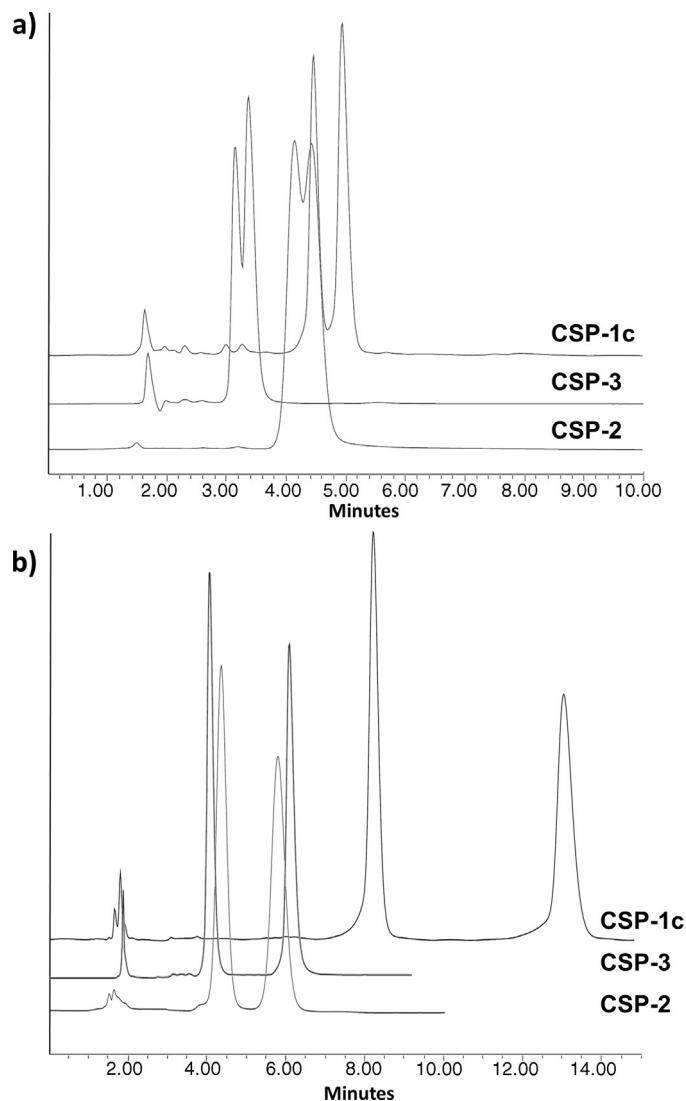


Fig. 6. Chromatographic enantioseparation of (a) **19** and (b) **21** on **CSP-1c**, **CSP-2** and **CSP-3**. Mobile phase: heptane/2-PrOH (90:10).

the improved efficiency (Fig. 4). The two factors contribute to the increase of resolution.

3.2. Enantioselectivity of **CSP-1c** monolithic column

Considering the recognition characteristics of polyproline CSs [8], a series of racemic test compounds, with emphasis in molecules bearing π -systems of different character or H-bond donor groups, were chosen in the evaluation of **CSP-1c**, (Fig. 2). A summary of the behaviour of the CSPs is shown in Table 2. Mixtures of heptane/2-propanol were used as mobile phase. Chlorinated solvents were avoided because of the restrictions imposed by the PEEK covers of the monolithic rods and reversed-phase conditions for their negative effect on enantioselectivity [6].

As previously observed for the bead-based polyproline derivatized column (**CSP-2**) [8], two different retention patterns were observed for the analytes considered. Retention was highly dependent on the presence of hydrogen-bond donor groups. Those analytes bearing hydrogen-bond donor groups showed high capacity factors (k_1) and were generally easily resolved on either **CSP-1c** or **CSP-2**. This observation confirms the major role that hydrogen bond has in the retention and recognition of analytes by polyproline CSs [8]. Analytes lacking hydrogen-bond donor group

Table 4Loading capacity. Molar amounts of analyte required to attain $R_s = 1$ (mobile phase: heptane/2-PrOH (90:10)).

Racemic compounds	nmol analyte ^a			(nmol analyte/nmol CS) · 10 ³		
	CSP-1c	CSP-2	CSP-3	CSP-1c	CSP-2	CSP-3
1	1120	59	84	2.49	0.31	0.32
2	1386	154	321	3.08	0.82	1.21
3	1809	588	964	4.02	3.12	3.63
4	6617	1361	2516	14.71	7.22	9.48

^a The molar amounts of analyte were calculated on the graphics shown in Fig. 6. The results were submitted to mathematical regression. When a function with a correlation factor over $r^2 = 0.98$ was obtained, the value corresponding to $R_s = 1$ was interpolated.

were retained with difficulty even when heptane/2-PrOH mixtures with a low content of the latter were used as a mobile phase. These analytes were not resolved on **CSP-2**. However, in spite of the low retention, some of these racemic test compounds were partially (**17**, **22**, **23**) or fully resolved on **CSP-1c** (**13**, **14**). Therefore, in general terms, **CSP-1c** showed higher separation factors (α), higher resolution (R_s) and a broader application domain than its bead-based counterpart **CSP-2**. When compared to substituted-polyproline-derived monolithic CSPs [6,7], greater separation factors were observed for the non-substituted columns, as expected.

3.3. Dependence of chromatographic performance on silica matrix format

In order to evaluate the effect of the silica matrix format, results obtained with **CSP-1a** (monolithic) were compared with those of **CSP-2** (bead-based). These two CSPs were chosen given their similar content in CS (Table 1). When compounds **1–4** were resolved either separation or resolution resulted to be significantly lower for the monolithic column **CSP-1a** (Table 3). The lower performance of **CSP-1a** was attributed to the presence of an important amount of unreacted aminopropyl groups on the matrix surface

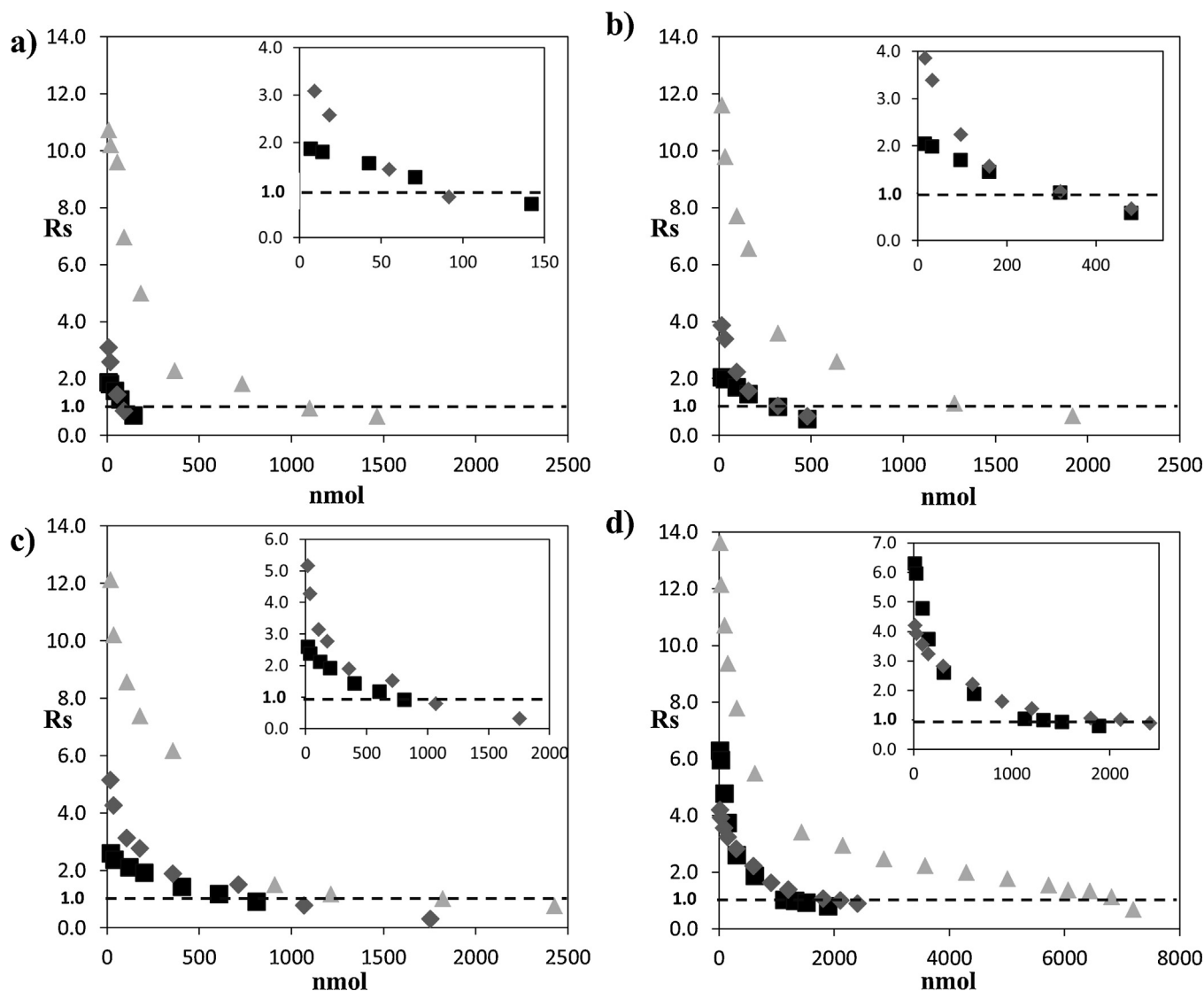


Fig. 7. Resolution attained for the injection of increasing amounts of (a) **1**, (b) **2**, (c) **3**, (d) **4**, on **CSP-1c** (\blacktriangle), **CSP-2** (\blacksquare), and **CSP-3** (\blacklozenge). Mobile phase: heptane/2-PrOH (90:10).

able to interact in an unspecific manner with the analytes. In an attempt to avoid the interference of these groups, a derivatized monolithic column (**CSP-3**) was prepared by linking directly the CS to the silica matrix. **CSP-3** was thus obtained when a monolithic silica gel column, which was not previously aminopropylated, was submitted to the same process described for **CSP-1a**.

In spite of the known low stability of silanol esters, **CSP-3** was tested with the same analytes and on analogous conditions as **CSP-1a** and **CSP-2**.¹ The new column, containing 1.4 times more CS than **CSP-2** (Table 1), produced the best enantioselectivity and resolution of the three columns tested (Table 3). Nevertheless, the improvement observed with respect to **CSP-2** was significantly higher than the one expected if a direct relationship between the amount of CS and enantioselectivity is considered. This result points to an additional factor provided by the matrix format. Therefore, it can be assumed that the better performance of **CSP-1c** is the result of a higher amount of CS in the column and a monolithic matrix effect. In Fig. 5 the comparison of chromatograms obtained in analogous conditions permits to illustrate the two factors in two of the analytes tested.

3.4. Loading ability of the different CSPs

High loading capacity is an essential feature for preparative purposes. Taking into account the increased derivatization degree permitted by the monolithic matrix format, it was considered of interest to determine the loading capacity for **1–4** on the three different CSPs prepared (**CSP-1c**, **CSP-2**, **CSP-3**) by injecting increasing amounts of the racemates until $R_s < 1$ was reached (Table 4, Fig. 6).

The loading capacity of **CSP-1c** resulted to be the highest of the three columns for all the analytes in study, which corresponds to the highest content of CS. When the molar amount of analytes resolved per mol of CS is taken into account (Table 4) differences in CS coverage for the distinct columns can be considered outweighed. In such conditions, **CSP-1c** still maintains a clear prevailing position. Thus, the increase in loadability observed cannot be justified only on the basis of a higher CS coverage (Fig. 7).

The molar amounts of each analyte resolved are in close relationship with the values of enantioselectivity and, in particular, with the resolution attained in all columns. Thus, the higher the resolution, the higher the loading capacity. Therefore, the results obtained for **CSP-2** (bead-based) are in all cases the lowest in the series. This result is related with the increased efficiency of the octaproline-derived monolithic columns respect the particle-based counterpart. An effect of the matrix format can be claimed at this point. This effect may be related to a higher accessibility of the analyte for the CS.

The results obtained with **CSP-3** were in all cases intermediate to those obtained for **CSP-1c** and **CSP-2** although closer to this latter than to the former, and therefore, lower than expected. The low retention of analytes in **CSP-3** may be responsible for the loading capacity results observed. Notwithstanding, **CSP-3** was able to clearly resolve molar amounts of analytes in average 1.7 times higher than **CSP-2**, although the molar ratio of CS between these two columns was only of 1.4.

4. Conclusions

When a monolithic silica gel chromatographic column stepwise derivatized with increasing amounts of an octaproline-derived

chiral selector (CS) was tested at each derivatization step, a linear relationship was observed between enantioselectivity and CS content. Resolution showed also an increasing, although non-linear, tendency.

Enantioselectivity, resolution and loading capacity of the monolithic column with the highest derivatization was always higher than that obtained for the bead-based CSP counterpart. Also, the octaproline-derivatized monolithic column permits the separation of some analytes lacking H-bond donor groups, thereby broadening the application domain observed formerly for the CS on bead-format matrices.

The observed improvements respect the octaproline-derived bead-based CSP cannot be explained on the sole basis of the increased CS coverage. For this reason a matrix effect, which may promote a better availability of the CS to the analytes, is suggested as an additional positive contribution to the improved results. Studies are in course to confirm this hypothesis.

Acknowledgements

The financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación and from the European Regional Development Fund (ERDF) (CTQ CTQ2010-15203/BQU) is gratefully acknowledged. Partial funding from the University of Barcelona is also acknowledged. A. Novell thanks the Generalitat de Catalunya for a doctoral fellowship.

References

- [1] N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner, Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 3–33.
- [2] A. Cavazzini, L. Pasti, A. Massi, N. Marchetti, F. Dondi, Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: a review, *Anal. Chim. Acta* 706 (2011) 205–222.
- [3] J. Huang, P. Zhang, H. Chen, T. Li, Preparation and evaluation of proline-based chiral columns, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3301–3308.
- [4] J. Huang, H. Chen, T. Li, Improvement of proline chiral stationary phases by varying peptide length and linker, *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 109–115.
- [5] J. Huang, H. Chen, P. Zhang, T. Li, Improvement of proline enantioselective stationary phases by replacing the 9-fluorenylmethoxycarbonyl group, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 307–311.
- [6] R. Sancho, A.M. Pérez, C. Minguillón, A (4R)-hydroxy-L-proline-derived chiral scaffold and its oligomers as chiral selectors in liquid chromatography chiral stationary phases for enantioseparation, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 905–914.
- [7] R. Sancho, C. Minguillón, Polypyrrolone derivatives as chiral selectors in high performance liquid chromatography: chromatographic and conformational studies, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 93–101.
- [8] A. Novell, C. Minguillón, Octaproline a conformationally flexible chiral selector in liquid chromatographic enantioseparation, *J. Chromatogr. A* 1363 (2014) 109–118.
- [9] R. Sancho, A. Novell, F. Svec, C. Minguillón, Monolithic silica columns functionalized with substituted polypyrrolone-derived chiral selectors as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 2805–2813.
- [10] B. Chankvetadze, C. Yamamoto, Y. Okamoto, Very fast enantioseparation in high-performance liquid chromatography using cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) coated on monolithic silica support, *Chem. Lett.* 32 (2003) 850–851.
- [11] B. Chankvetadze, T. Ikai, C. Yamamoto, Y. Okamoto, High-performance liquid chromatographic enantioseparations on monolithic silica columns containing a covalently attached 3,5-dimethylphenylcarbamate derivative of cellulose, *J. Chromatogr. A* 1042 (2004) 55–60.
- [12] G. Guiochon, Monolithic columns in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1168 (2007) 101–168.
- [13] B. Chankvetadze, C. Yamamoto, N. Tanaka, K. Nakanishi, Y. Okamoto, High-performance liquid chromatographic enantioseparations on capillary columns containing monolithic silica modified with cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate), *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 905–911.
- [14] B. Chankvetadze, T. Kubota, T. Ikai, C. Yamamoto, M. Kamigaito, N. Tanaka, et al., High-performance liquid chromatographic enantioseparations on capillary columns containing crosslinked polysaccharide phenylcarbamate derivatives attached to monolithic silica, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1988–1995.
- [15] B. Chankvetadze, C. Yamamoto, M. Kamigaito, N. Tanaka, K. Nakanishi, Y. Okamoto, High-performance liquid chromatographic enantioseparations on capillary columns containing monolithic silica modified with amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate), *J. Chromatogr. A* 1110 (2006) 46–52.

¹ **CSP-3** was used shortly after its preparation. Its performance was tested from time to time using racemates **1–4**. The chromatographic parameters obtained were maintained stable along the study. Nevertheless, the chromatographic behaviour of **CSP-3** was seriously affected after using acidic conditions.

- [16] F. Svec, Recent developments in the field of monolithic stationary phases for capillary electrochromatography, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 729–745.
- [17] Y. Xu, Q. Cao, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Porous polymer monolithic column with surface-bound gold nanoparticles for the capture and separation of cysteine-containing peptides, *Anal. Chem.* 82 (2010) 3352–3358.
- [18] M. Kato, K. Sakai-Kato, T. Toyooka, Silica sol–gel monolithic materials and their use in a variety of applications, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1893–1908.
- [19] D. Wistuba, Chiral silica-based monoliths in chromatography and capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 941–952.
- [20] X. Chen, W. Yang, Y. Zhou, F. Jiao, In situ synthesis of monolithic molecularly imprinted stationary phases for liquid chromatographic enantioseparation of dibenzoyl tartaric acid enantiomers, *J. Porous Mater.* 19 (2012) 587–595.
- [21] B. Chankvetadze, Monolithic chiral stationary phases for liquid-phase enantioseparation techniques, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 305–314.
- [22] D. Lubda, W. Lindner, Monolithic silica columns with chemically bonded tert-butylcarbamoylquinine chiral anion-exchanger selector as a stationary phase for enantiomer separations, *J. Chromatogr. A* 1036 (2004) 135–143.

4.4. Efecte de les condicions supercrítiques en l'enantioselectivitat i el comportament cromatogràfic de fases estacionàries quirals derivades de poliprolina

4.4.1. Precedents

La cromatografia de fluids supercrítics (SFC) és una variant habitual de la cromatografia en fase normal que s'utilitza per a l'anàlisi i també purificació de molècules de baix a moderat pes molecular i tèrmicament làbils. Sens dubte, una de les seves majors aplicacions és la separació de compostos quirals. Els principis d'aquesta tècnica són similars als de l'HPLC essent la característica principal de la SFC la utilització de fluids en estat supercrític o subcrític com a fase mòbil. Les més corrents són compostes de diòxid de carboni pressuritzat, juntament amb un co-solvent com a modificador de la polaritat. L'ús de CO₂ com eluent és el més extensament utilitzat per diverses raons: els valors de pressió i temperatura crítica es poden assolir fàcilment, es troba disponible en alta qualitat i no és ni inflamable ni tòxic. També, el seu ús facilita l'eliminació del dissolvent quan aquesta tècnica s'utilitza amb fins preparatius. Per totes aquestes raons, la SFC es considera una tecnologia medio-ambientalment sostenible.

Atesa la dependència existent entre l'enantioselectivitat de les FEQs amb SQs derivats d'oligoprolina i la natura de la barreja dissolvent utilitzada com a fase mòbil, es va considerar d'interès l'estudi del comportament d'aquests mateixos selectors immersos en una barreja CO₂/modificador en condicions supercrítiques. Per tant, en aquest article s'analitza el comportament enantioselectiu de les quatre FEQs (Figura 4.4) de que ja es disposava: dos SQs diferents, poliprolina substituïda i octaprolina no substituïda, sobre dues matrius cromatogràfiques diferents, monolítica i de partícules.

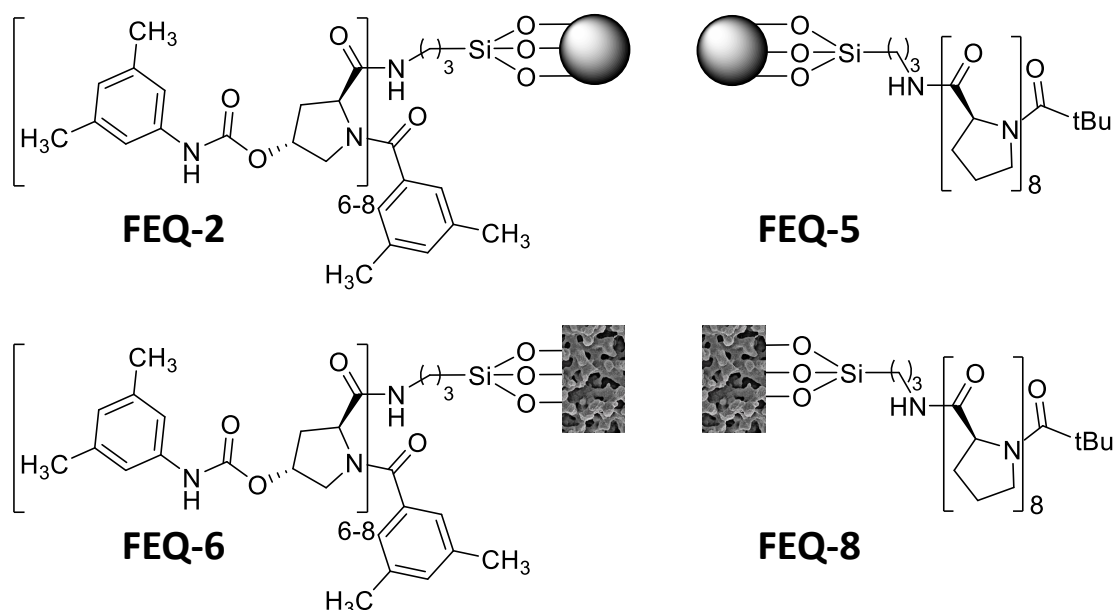


Figura 4.4. Fases estacionàries quiral emprades en aquest estudi [116]. Les FEQs particulades **FEQ-2** i **FEQ-5** corresponen a **CSP-1** i **CSP-3**, respectivament, en l'article. Les FEQs monolítiques **FEQ-6** i **FEQ-8** corresponen a **CSP-2** i **CSP-4**, respectivament.

4.4.2. Desenvolupament i conclusions

L'objectiu principal d'aquest estudi consisteix en determinar l'enantioselectivitat i el comportament cromatogràfic d'aquestes FEQs quan s'utilitzen condicions de cromatografia supercrítica, utilitzant com a modificadors de la polaritat, 2-PrOH, EtOH i diclorometà. A més a més, també s'estableix una comparació entre els resultats cromatogràfics obtinguts en condicions convencionals de fase normal (selectivitat, eficiència, resolució i temps d'anàlisi) i aquells resultats observats en les noves condicions supercrítiques. Cal també senyalar que és el primer estudi en el qual s'apliquen les condicions de cromatografia de fluids supercrítics sobre fases estacionàries amb suports cromatogràfics basats en monòlits. Les propietats intrínseques d'aquests materials, la seva permeabilitat i l'elevada disponibilitat del SQ, juntament amb l'alta difusió dels fluids supercrítics, poden actuar sinèrgicament per tal permetre incrementar el flux de fase mòbil i assolir així situacions de *high-throughput* i/o elevar la capacitat de càrrega.

Article IV [116]

Arnau NOVELL, Alberto MÉNDEZ, Cristina MINGUILLÓN*, “Effects of SFC conditions on enantioselectivity and performance of polyproline-derived CSPs”, *Journal of Chromatography A*, 1403 (2015) 138-143

Índex d’Impacte (JCR 2014): **4,169**

Posició en l’àrea de Química Analítica (JCR 2014): **6/74**



Effects of supercritical fluid chromatography conditions on enantioselectivity and performance of polyproline-derived chiral stationary phases



Arnau Novell^a, Alberto Méndez^b, Cristina Minguillón^{a,*}

^a University of Barcelona, Campus Torribera, E-08921 Santa Coloma de Gramenet Barcelona, Spain

^b Waters Cromatografia S.A., Ronda Can Fatjó 7-A, 08290 Cerdanyola del Vallés Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 March 2015

Received in revised form 11 May 2015

Accepted 12 May 2015

Available online 21 May 2015

Keywords:

Poly-L-proline oligomers

Monolithic columns

Enantioselectivity

Chiral stationary phases

Supercritical fluid chromatography

ABSTRACT

The chromatographic behaviour and performance of four polyproline-derived chiral stationary phases (CSPs) were tested using supercritical fluid chromatography (SFC). A series of structurally related racemic compounds, whose enantioseparation was proved to be sensitive to the type of mobile phase used in NP-HPLC, were chosen to be tested in the SFC conditions. Good enantioselection ability was shown by the CSPs for the analytes tested in the new conditions. Resolution, efficiency and analysis time, were considerably improved with respect to NP-HPLC when CO₂/alcohol mobile phases were used. Monolithic columns clearly show enhanced chromatographic parameters and improved performance respect to their bead-based counterparts.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

At present, enantioselective chromatography has become a mature technique and chiral stationary phases (CSPs) nearly routine tools in the analysis and purification of enantiomers [1]. However, new chiral structures have been recently introduced as chiral selectors (CSs) in CSPs. Among them, oligopolyproline-derived CSs show some particular characteristics in their chromatographic behaviour which make them an interesting subject of deeper study [2–5]. In spite of being oligoproline CSs of relatively low-molecular weight, they show a higher enantioselectivity and a broader application domain than most brush-type CSPs [4,5]. Moreover, a strong dependence of enantioselectivity on the mobile phase composition has been observed when this kind of CSs is applied to HPLC [6,7]. Changes in enantioselectivity can be attributed in this case to the conformational flexibility of the CS. It is known that polyproline conformation depends on the kind of solvent in which the peptide is immersed. The so-called PPII helical conformation [8] dominates in most solvents while PPI conformation [9] is only favoured in a limited number of them [10].

In our previous studies involving oligoproline-based CSs, a decrease in enantioselectivity was observed in the absence of hydrogen bond donor solvents and, in particular, when chlorinated solvents were part of the mobile phase mixture. This was attributed to a conformational CS disorder promoted in such conditions [7]. The observation reinforces with chemical evidence the theoretical results obtained by Cann and co-workers [11,12]. Using molecular dynamics calculations, these authors concluded that protic solvents alter the distribution of conformational populations for polyproline CSs by establishing H-bonding.

The loss of enantioselection ability was proved to be reversible by either adding a small amount of 2-propanol (2-PrOH) in the mixture, or by switching to conventional Heptane/2-PrOH normal phase conditions [13]. However, the recovery of enantioselectivity takes longer than a simple equilibration of the column. Thanks to its hydrogen bonding ability, 2-PrOH promotes a more ordered conformational structure for the CS. This hypothesis is in good agreement with the spectroscopic results obtained by Zhang and co-workers for a decaprolin oligomer in solution containing or not 2-PrOH [14].

Having already tested oligopolyprolines as CSs in a diversity of HPLC conditions and solvents [6,7,13,15,16], we were interested in examining their behaviour in supercritical fluid chromatography (SFC). SFC conditions, using CO₂ as a main component of the mobile phase, parallels normal phase HPLC [17]. The low viscosity and higher diffusivity of the SFC mobile phase shifts the optimum linear velocity

* Corresponding author. Tel.: +34 93 403 37 87.

E-mail address: cminguillon@ub.edu (C. Minguillón).

to higher values compared to liquids [18]. Thus, higher flow rates can be used, which reduce analysis and equilibration times, and increases high-throughput capacity [19]. Moreover, SFC is increasingly applied to the separation of enantiomers and offers significant advantages especially for preparative purposes [20]. Among them, the separated enantiomers can be easily recovered after separation by evaporation of the low amount of co-solvent used. This involves a significant reduction in waste generation and disposal [18].

In order to complete the range of conditions in which polyproline-derived CSPs have been tested, a series of oligoproline derived columns (Table 1) were here used in SFC conditions using CO₂ added with several organic modifiers. Two different CSs (substituted and non-substituted polyprolines) and two matrix formats (bead based and monolithic) are studied in the enantioseparation of a series of structurally close compounds (Fig. 1). The higher loading capacity [15,16] shown by monolithic oligoproline CSPs over their bead-based counterparts, together with the intrinsic higher permeability of the former [15], makes the use of SFC interesting. Moreover, to the best of our knowledge there are not many applications of the monolith format, enantioselective or not, to SFC [21].

The aim of this work is to test the chromatographic behaviour of oligoproline derivatives in SFC conditions. Also, to examine the possible advantages or disadvantages provided by the two matrix formats and the enantioselective behaviour of polyproline CSs in such conditions. The chromatographic results (enantioselectivity, resolution, efficiency and analysis time) will be compared with those obtained previously in HPLC [6,7,13,15,16].

2. Materials and methods

2.1. General supplies and equipment

Racemic compounds (Fig. 1) were prepared by treating 1-(2-naphthyl)ethylamine with the corresponding benzoyl chloride [22,23]. Samples were prepared by dissolving them in different mixtures of heptane/2-PrOH at a concentration of 1 mg/mL. Oligoproline CSs and the corresponding CSPs were synthesized in our laboratory following already described procedures [6,7,13,15,16] (Table 1). Concretely, the preparation of **CSP-1** is described in [6], **CSP-2** in [15], **CSP-3** in [13] and **CSP-4** in [16].

Food grade carbon dioxide was obtained from AirLiquide (Martorell, Spain). Ethanol (EtOH), 2-propanol (2-PrOH), dichloromethane (DCM) and heptane (HPLC grade) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

A Waters UPC² system (Mildford, MA, USA) equipped with a fluid delivery module (a liquid CO₂ pump and a modifier pump), a FL autosampler, two auxiliary column managers allowing four installed columns, a photodiode array UV detector and Empower software for instrument and data control was used.

2.2. Chromatographic measurements

When working in NP-HPLC, a total flow rate of 1 mL/min was used and the temperature was set at 25 °C. In SFC, all experiments were performed at a total flow rate of 4 mL/min. Temperature was set at 35 °C and backpressure at 140 bar. Ethanol, 2-propanol and dichloromethane were used as organic modifiers. All mobile phase compositions are expressed in volume-ratios (v/v). 1,3,5-*tert*-butylbenzene was used as void volume marker (*t*₀). Injection volume was 10 µL. UV Detection was set at 220 nm or at 254 nm, depending on the analyte. The elution order of enantiomers was determined using samples enriched in one of the two enantiomers of known absolute configuration.

Retention factor (*k*) was calculated as $(t_r - t_0)/t_0$ in which *t*_r is the retention time and *t*₀ the void time. The enantioseparation factor (α) was obtained as the ratio of retention factors for the two enantiomers. Resolution was calculated as $2(t_2 - t_1)/(\omega_2 + \omega_1)$, where ω_i is the peak width at the baseline.

3. Results and discussion

Polyproline-based CSs, and the CSPs in which they are contained, show interesting properties in their application to the preparative separation of enantiomers. Among them, a high loading capacity is observed for these CSPs in spite of being the CS one of relatively low molecular weight [6]. In previous studies, this property has been even improved by the use of monolithic silica matrix format, which permits a higher derivatization degree of the matrix support and a higher availability of the CS than the bead-based matrix format [15,16]. All these factors contribute to enhance the desirable features for a CSP to be used in preparative separations.

Nowadays, SFC is increasingly applied to preparative enantioseparations. The application of these CSPs to such conditions could provide an even further improvement for polyproline CSPs. Nevertheless, given the known dependence of enantioselectivity on solvent for this kind of CSs, a preliminary test of their enantioselective behaviour in SFC is required. It is for this reason that a series of closely related racemic compounds (Fig. 1), which have demonstrated its sensitivity to the conditions used, has been chosen. Thus, racemates **1–4** had already been well resolved on the same CSPs in NP-HPLC when heptane/2-PrOH mixtures are used as mobile phase. However, enantioseparation highly decreases when using heptane/chlorinate solvents mixtures. Moreover, the composition of the mobile phase in SFC has been maintained as close as possible to the one used in NP-HPLC. Concretely, heptane has been replaced by CO₂ while maintaining 2-PrOH as organic modifier. Other organic modifiers (EtOH, DCM) were also tested. The results obtained when using 2-PrOH and EtOH as co-solvents (Table 2) have been analyzed on the view of the variables considered. The use of DCM (30% in CO₂), in spite of producing an acceptable retention of the analytes (*k* values in the range of 6.5–14.0, with *t*₀ of 0.3 min), resulted in the loss of enantioseparation.

3.1. Enantioselectivity and efficiency in SFC conditions. Influence of the organic modifier

It is well-known that selectivity and efficiency in SFC are influenced by the nature of the organic modifier. In addition to 2-PrOH, the effect of EtOH on retention time, enantioselectivity and resolution was studied.

The racemates tested were resolved in all CSPs when mixtures CO₂/H-bond donor solvent (2-PrOH, EtOH) were used as mobile phase. Enantioseparation factors were of the same order of magnitude as those obtained in NP-HPLC (Table 2). Similarly to what happens for this kind of CSPs in NP-HPLC, enantioselectivity vanishes when DCM is used as organic modifier. As formerly observed when switching between heptane/2-PrOH and heptane/DCM in NP-HPLC, The loss of selectivity was proved to be reversible [13]. This observation seems to corroborate the similarity in the conformational behaviour of the CS in the two different conditions. Also, the elution order of the enantiomers was found to be the same in LC and in SFC, probably due to a similar CS conformation and recognition mechanism.

Nevertheless, given the particular diffusivity of supercritical fluids, the time needed to lose and recover enantioselectivity is much shorter in SFC (in the order of 20 min, roughly the time needed to equilibrate the column) than in NP-HPLC (around 450 min, [13]).

Table 1
Summary of characteristics of the CSPs studied.

Name	Chiral stationary phase	Matrix support format	CS content $\mu\text{mol/column}$	Column size	Description of CSP preparation
CSP-1		Bead-based Particle size: 5 μm	25.1	150 mm \times 4.6 mm id	[6]
CSP-2		Monolithic	91.5	100 mm \times 4.6 mm id	[15]
CSP-3		Bead-based Particle size: 5 μm	188.6	100 mm \times 4.6 mm id	[13]
CSP-4		Monolithic	449.7	100 mm \times 4.6 mm id	[16]

The efficiency of the CSPs for the first eluted enantiomer was comparatively studied for NP-HPLC and SFC conditions. Given that column length was not the same for all CSPs, plate height values (H - μm) were considered in this comparison (Fig. 2).

Three different trends can be noticed. Firstly, better efficiency values (lower H values) are obtained in SFC using EtOH as a co-solvent than when 2-PrOH is used either in HPLC or SFC for the same column. Nevertheless, on the CSPs containing the non-substituted CS (**CSP-3** and **CSP-4**) only slight changes in H values are observed when changing conditions. Secondly, H values are lower for CSPs containing the non-substituted CS (**CSP-3** and **CSP-4**) than for their corresponding substituted counterparts. There is only one

exception to this general behaviour, the separation of **3** in SFC using 2-PrOH as a modifier. Thirdly, when the matrix format is taken into account, H is always lower for monoliths than for the corresponding bead-based analogues when SFC conditions are applied.

These facts suggest that the combination of the monolithic format with SFC conditions leads to optimal efficiencies. Overall, it is worth noting that **CSP-4** shows the best efficiencies for all the analytes in the three different conditions tested and the top results when using EtOH as organic modifier in SFC.

Resolution values (Table 2) obtained in SFC (2-PrOH) are of the same order of magnitude, or slightly higher, than those obtained in NP-HPLC conditions. These values slightly decrease when EtOH

Table 2
Chromatographic results.

Racemic Compounds	CSP-1			CSP-2			CSP-3			CSP-4			Mobile Phase
	k_1	α	R_s	k_1	α	R_s	k_1	α	R_s	k_1	α	R_s	
1	4.23(R)	3.33	6.96	6.86 ^b	2.54	3.37	2.41(R)	1.65	1.87	3.61	2.47	9.38	A
2	2.69 ^a	1.43	4.14	0.77 ^b	2.50	4.90	1.13	1.86	3.16	1.22	2.61	10.72	
3	3.74 ^a	1.39	2.05	1.24 ^b	2.74	4.07	1.72	1.98	3.70	1.33	3.31	11.92	
4	9.65 ^a	1.23	1.69	2.87 ^b	1.68	2.41	2.57	2.31	4.61	2.98	3.51	12.66	
1	4.31(R)	2.28	4.73	13.50 ^d	2.67	8.08	6.32(R)	1.65	3.05	5.78	3.16	12.24	B
2	13.18 ^c	1.34	1.31	4.29 ^d	2.46	6.64	3.77	1.90	3.78	3.92	3.21	10.39	
3	26.63 ^c	1.15	0.73	4.54 ^d	2.75	6.64	3.52	1.79	3.28	3.72	2.92	8.55	
4	40.70 ^c	1.10	0.44	6.26 ^d	1.53	3.34	4.65	2.00	4.05	4.22	3.47	10.69	
1	2.99	1.60	3.45	6.59 ^f	1.97	6.64	4.34	1.35	1.78	3.67	2.17	9.33	C
2	8.12 ^e	1.26	1.42	2.53 ^f	1.76	4.57	3.47	1.49	2.43	2.97	2.39	9.07	
3	13.82 ^e	1.14	0.85	2.40 ^f	1.98	5.46	3.10	1.49	2.48	2.55	2.41	8.05	
4	17.88 ^e	1.10	0.67	2.98 ^f	1.38	2.80	3.68	1.64	3.20	2.84	2.77	11.01	

B. Heptane/2-PrOH (90:10) $F = 1 \text{ mL/min}$. ^a Heptane/2-PrOH (98:2) ^d CO₂/2-PrOH (80:20).

C. CO₂/2-PrOH (90:10) $F = 4 \text{ mL/min}$ ^b Heptane/2-PrOH (80:20) ^e CO₂/EtOH (98:2).

D. CO₂/EtOH (90:10) $F = 4 \text{ mL/min}$ ^c CO₂/2-PrOH (98:2) ^f CO₂/EtOH (80:20).

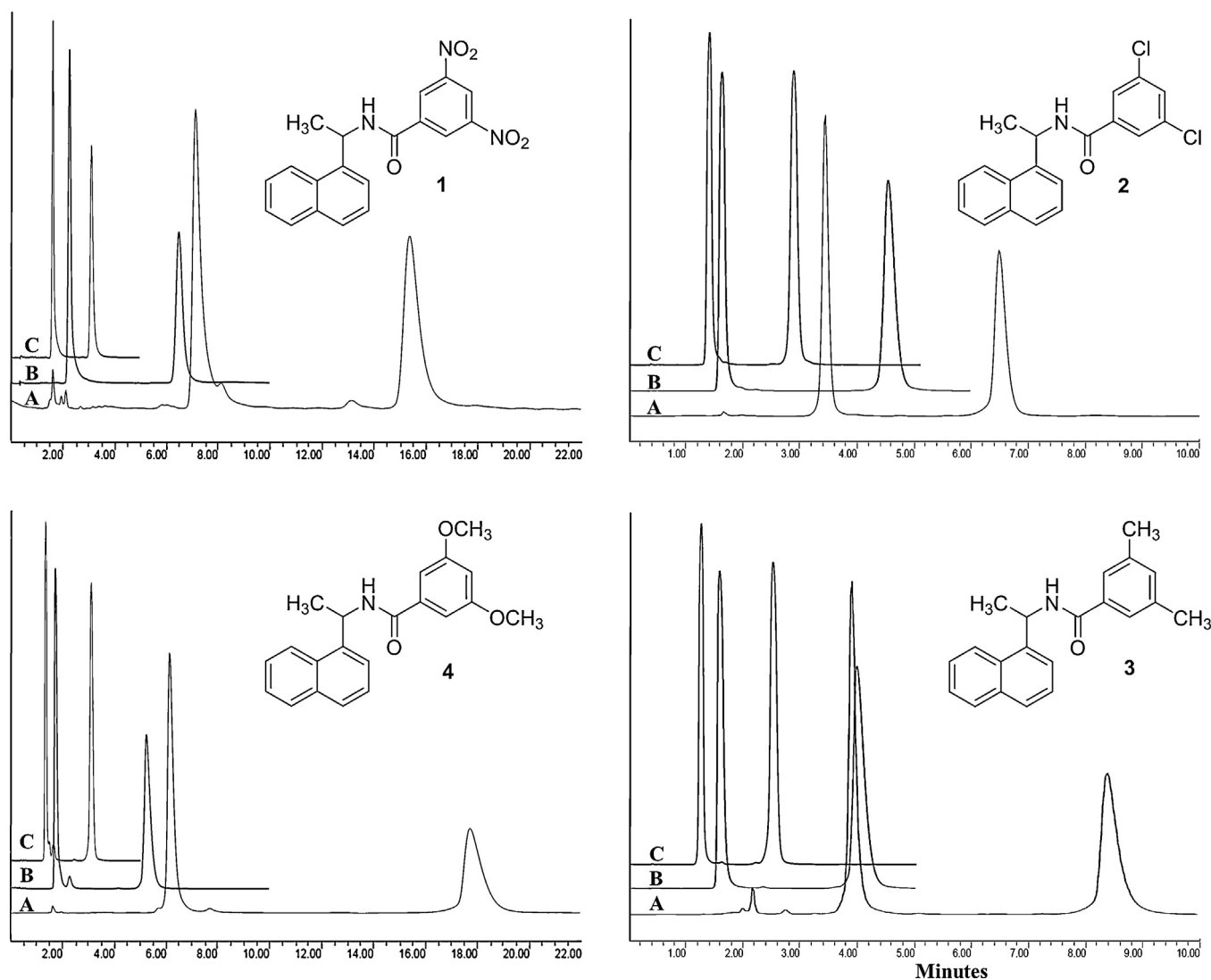


Fig. 1. Chemical structures of the racemic compounds tested (**1–4**) and enantioseparations obtained on **CSP-4**. Conditions: (A) NP-HPLC: Heptane/2-PrOH (9:1); flow, 1 mL/min, (B) SFC: CO₂/2-PrOH (9:1); flow, 4 mL/min, (C) SFC: CO₂/EtOH (9:1); flow, 4 mL/min.

is used. Nevertheless, **CSP-1** constitutes an exception, as resolution values obtained in SFC are considerably lower than in NP-HPLC. The wide peaks and long retention times shown by **CSP-1** lead to a notorious loss of resolution respect those obtained in NP-HPLC.

The higher resolution shown by monolithic columns respect to their bead-based counterparts was significant. Again, this observation can be attributed to the synergistic effect of the monolithic format together with the application of SFC conditions.

3.2. Substituted/non-substituted CS and monolithic/bead-format matrices

In past studies, when the chromatographic behaviour of a non-substituted octapropylene-derived particle-based CSP (**CSP-3**) was compared to **CSP-1** [13] using different mobile phases, most analytes bearing an H-bond donor group were better resolved on **CSP-3** than on **CSP-1**. This was the case for the series of racemic compounds here tested. Some racemates containing 3,5-dinitrobenzoyl groups constituted the only exception to this general behaviour. On the basis of this observation it can be assumed that enantio-recognition mechanism in polypropylene-derived CSPs is mainly based on

hydrogen bond interactions, while π - π interactions may play a role only in case of the substituted CS (**CSP-1** and **CSP-2**). The same behaviour is here observed for bead-based CSPs containing substituted and non-substituted CSs (**CSP-1** and **CSP-3**, respectively) on SFC. This effect is less significant for monolithic CSPs, in which the highest enantioselectivity is attained for **CSP-4** in all instances. Nevertheless, it has to be kept in mind that this latter contains the highest amount of CS (2.4 times more CS than **CSP-3** and 4.9 times more than **CSP-2**), a factor that may also have positively influenced enantioselectivity.

Regarding the matrix format, monolithic columns provided higher values of enantioselectivity, resolution and efficiency than their bead-based counterparts either in NP-HPLC and SFC, as already mentioned. This pattern, made evident in NP-HPLC conditions, was considerably emphasised when working in SFC.

3.3. Time of analysis

The clear advantage of SFC is made evident when the time involved in elution is considered (Table 3, Fig. 1). Supercritical conditions provide in all instances shorter analysis time than NP-HPLC.

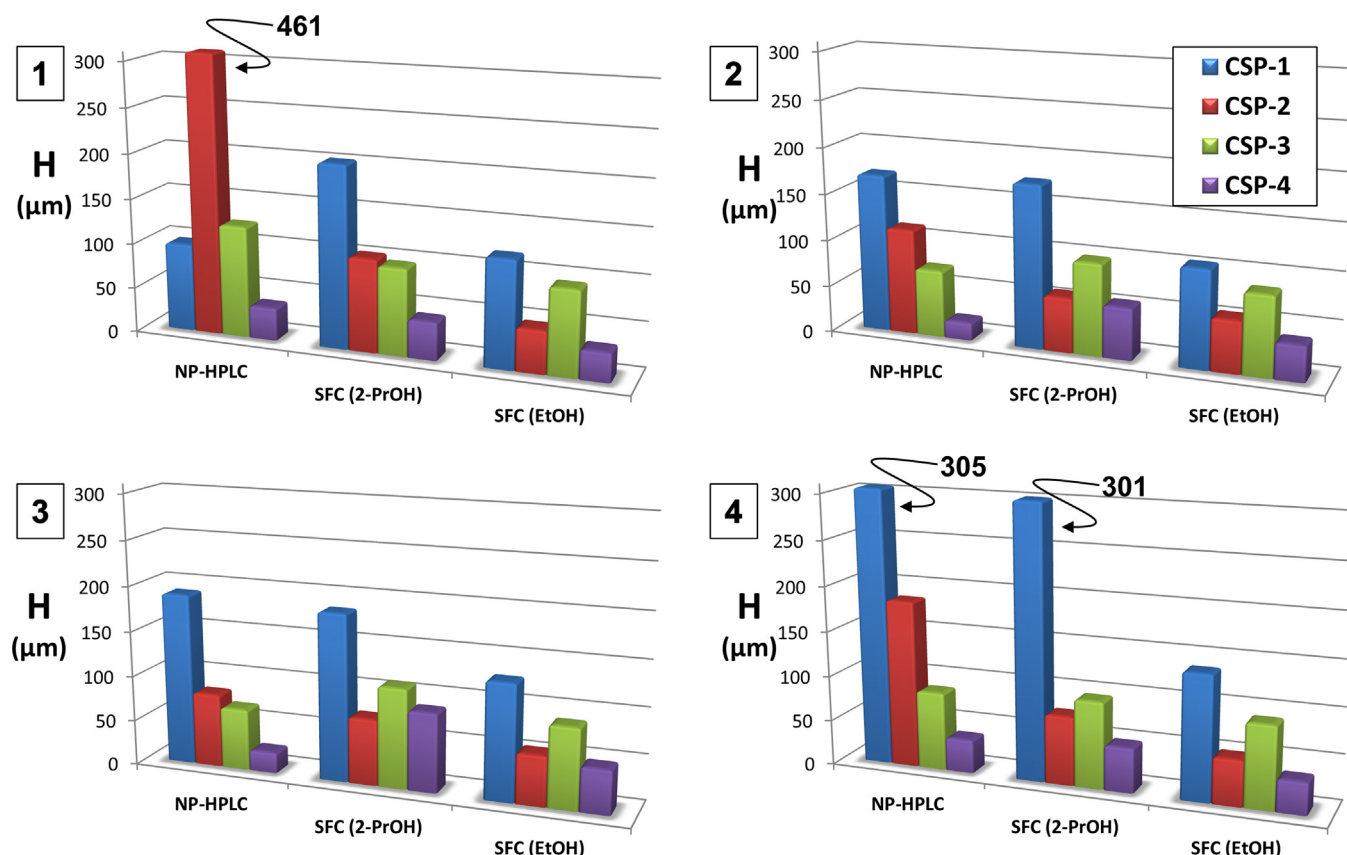


Fig. 2. Comparison of plate height (H) in μm for the first eluted enantiomer of the racemic analytes (1–4), columns (CSP-1–4) and conditions tested. H takes the lowest values for CSP-4 in SFC (CO_2/EtOH).

Table 3
Analysis time (min) required for the complete elution of the two enantiomers.

Racemic compounds	CSP-1	CSP-2	CSP-3	CSP-4	Mobile phase
1	16.0	35.0 ^b	8.0	18.0	Heptane/2-PrOH (90:10) $F = 1 \text{ mL/min}$
2	9.5 ^a	5.0 ^b	4.5	7.2	
3	14.0 ^a	9.0 ^b	5.5	9.5	
4	28.0 ^a	11.0 ^b	11.0	20.0	
1	6.0	13.0 ^d	4.0	7.5	$\text{CO}_2/2\text{-PrOH}$ (90:10) $F = 4 \text{ mL/min}$
2	10.0 ^c	4.5 ^d	3.0	5.2	
3	16.0 ^c	5.5 ^d	3.0	4.6	
4	20.0 ^c	4.5 ^d	4.0	6.0	
1	3.0	5.3 ^f	2.2	4.0	CO_2/EtOH (90:10) $F = 4 \text{ mL/min}$
2	6.0 ^e	2.2 ^f	2.0	3.2	
3	9.0 ^e	2.5 ^f	1.8	3.0	
4	11.0 ^e	2.1 ^f	2.4	3.5	

^a Heptane/2-PrOH (98:2).

^b Heptane/2-PrOH (80:20).

^c $\text{CO}_2/2\text{-PrOH}$ (98:2).

^d $\text{CO}_2/2\text{-PrOH}$ (80:20).

^e CO_2/EtOH (98:2).

^f CO_2/EtOH (80:20).

When EtOH is used this behaviour is even more pronounced. Actually, when $\text{CO}_2/2\text{-PrOH}$ was used as a mobile phase, the analysis time average for the analytes tested was reduced to the half of that needed in NP-HPLC. Moreover, when CO_2/EtOH is used, the total length of the chromatograms could be shortened to a fourth of the one needed when eluting with heptane/2-PrOH.

Considering the matrix format, the monolithic columns were able to provide a more significant reduction of analysis time than their bead-based counterparts.

4. Conclusions

When SFC using 2-PrOH as organic modifier is applied to polyproline-derived CSPs, the enantioselectivity obtained is in the same order of magnitude or slightly higher than that shown in NP-HPLC using heptane/2-PrOH as a mobile phase. Although a scarce decrease of enantioselectivity is evidenced when using EtOH as a co-solvent, shorter retention times are observed. However, the efficiency of columns significantly increases when the latter

is used instead of 2-PrOH as organic modifier. These two factors compensate to each other yielding in EtOH resolution values only slightly lower than those obtained when using 2-PrOH as a modifier. However, the most significant advantage of SFC conditions is the significant reduction of the analysis time with respect to NP-HPLC conditions.

Regarding the matrix support format, monoliths are able to provide higher enantioselectivity and better performance than their bead-based analogues, in either NP-HPLC or SFC (especially in the latter). The use of supercritical conditions on oligoproline-derivatized monoliths makes these columns promising tools for high-throughput analysis and semi/preparative purposes.

Acknowledgements

The financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación and from the European Regional Development Fund (ERDF) (CTQ2010-15203/BQU and CTQ2013-44077-R) is gratefully acknowledged. Partial funding from the University of Barcelona is also acknowledged. A. Novell thanks the Generalitat de Catalunya for a doctoral fellowship.

References

- [1] A. Novell, C. Minguillón, Chiral chromatographic methods in the analysis and purification of enantiomers, in: V. Andrushko, N. Andrushko (Eds.), *Stereoselective Synth. Drugs Nat. Prod.*, first ed., Wiley, Hoboken, 2013, pp. 1601–1628.
- [2] A. Cavazzini, L. Pasti, A. Massi, N. Marchetti, F. Dondi, Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: a review, *Anal. Chim. Acta* 706 (2011) 205–222.
- [3] J. Huang, P. Zhang, H. Chen, T. Li, Preparation and evaluation of proline-based chiral columns, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3301–3308.
- [4] J. Huang, H. Chen, P. Zhang, T. Li, Improvement of proline enantioselective stationary phases by replacing the 9-fluorenylmethoxycarbonyl group, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 307–311.
- [5] J. Huang, H. Chen, T. Li, Improvement of proline chiral stationary phases by varying peptide length and linker, *J. Chromatogr. A* 1113 (2006) 109–115.
- [6] R. Sancho, A.M. Pérez, C. Minguillón, A. (4R)-hydroxy-L-proline-derived chiral scaffold and its oligomers as chiral selectors in liquid chromatography chiral stationary phases for enantioseparation, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 905–914.
- [7] R. Sancho, C. Minguillón, Polyproline derivatives as chiral selectors in high performance liquid chromatography: chromatographic and conformational studies, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 93–101.
- [8] P.M. Cowan, S. McGavin, Structure of poly-L-proline, *Nature* 176 (1955) 501–503.
- [9] W. Traub, U. Shmueli, Structure of poly-L-proline I, *Nature* 198 (1963) 1165–1166.
- [10] Y.-C. Chiang, Y.-J. Lin, J.-C. Horng, Stereoelectronic effects on the transition barrier of polyproline conformational interconversion, *Protein Sci.* 18 (2009) 1967–1977.
- [11] M. Ashtari, N.M. Cann, Proline-based chiral stationary phases: a molecular dynamics study of the interfacial structure, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6331–6347.
- [12] M. Ashtari, N.M. Cann, Poly-proline-based chiral stationary phases: a molecular dynamics study of triproline, tetraproline, pentaproline and hexaproline interfaces, *J. Chromatogr. A* 1265 (2012) 70–87.
- [13] A. Novell, C. Minguillón, Octaproline, a conformationally flexible chiral selector in liquid chromatographic enantioseparation, *J. Chromatogr. A* 1363 (2014) 109–118.
- [14] P. Zhang, P.L. Polavarapu, J. Huang, T. Li, Spectroscopic rationalization of the separation abilities of decaproline chiral selector in dichloromethane-isopropanol solvent mixture, *Chirality* 105 (2007) 99–105.
- [15] R. Sancho, A. Novell, F. Svec, C. Minguillón, Monolithic silica columns functionalized with substituted polyproline-derived chiral selectors as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 2805–2813.
- [16] A. Novell, C. Minguillón, Monolithic silica columns with covalently attached octaproline chiral selector. Dependence of performance on derivatization degree and comparison with a bead-based analogue, *J. Chromatogr. A* 1384 (2015) 124–132.
- [17] C. West, E. Lesellier, Effects of mobile phase composition on retention and selectivity in achiral supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1302 (2013) 152–162.
- [18] K. De Klerck, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, Supercritical fluid chromatography for the enantioseparation of pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 69 (2012) 77–92.
- [19] K. De Klerck, G. Parewyck, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, Enantioselectivity of polysaccharide-based chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography using methanol-containing carbon dioxide mobile phases, *J. Chromatogr. A* 1269 (2012) 336–345.
- [20] L. Miller, Preparative enantioseparations using supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1250 (2012) 250–255.
- [21] F. Gritti, G. Guiochon, Limit of the speed-resolution properties in adiabatic supercritical fluid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1295 (2013) 114–127.
- [22] L. Oliveros, C. Minguillón, T. González, Comparison between silica-bonded chiral stationary phases derived from 3,5-disubstituted *N*-benzoyl-(*S*)-phenylalanine and (*S*)-cyclohexylalanine in the resolution of racemic compounds by liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 672 (1994) 59–65.
- [23] L. Oliveros, C. Minguillón, B. Desmazières, P.-L. Desbène, Silica-bonded chiral stationary phases with structurally simple p-donor chiral selectors for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 589 (1992) 53–59.

DISCUSSIÓ GENERAL

DISCUSSIÓ GENERAL

5.1. Aspectes generals

En aquest capítol es presenta una discussió general dels resultats obtinguts en els diferents estudis inclosos en el present treball. Aquesta tesi doctoral està formada per una compilació d'articles ordenats per data de publicació. Tant l'ordre cronològic de les publicacions com l'estructura de la tesi doctoral han estat ideats per tal de facilitar la comprensió i la interpretació dels resultats al lector, però no corresponen amb l'ordre en el temps de les investigacions.

Com s'ha vist en els objectius, tres són els elements que s'han abordat en la present tesi doctoral. A grans trets, aquests són l'estructura del SQ, el tipus de fase mòbil utilitzada i la matriu cromatogràfica. Per tant, els treballs realitzats s'han centrat en l'estudi estructural del SQ en diverses condicions cromatogràfiques, en l'ús de FEQs derivades de poliprolina amb diverses fases mòbils i en la preparació de fases estacionàries quirals sobre matrius cromatogràfiques de sílice de diferent format, particulat i monolítics. La combinació d'una estructura quiral amb una major capacitat enantioselectiva, juntament amb un tipus de fase mòbil que afavoreixi les interaccions necessàries SQ-analític i una matriu cromatogràfica que permeti una major disponibilitat del SQ, han conduït a un material optimitzat per a les separacions enantioselectives considerades.

5.2. Estructura química del selector quiral octaprolina no substituïda

En primer lloc s'ha descrit extensament la síntesi d'un SQ. Es tracta d'un àcid orgànic derivat d'un octapèptid amb vuit unitats de L-prolina en el qual s'hi ha introduït un grup pivaloil en l'extrem amino terminal. De la mateixa manera que altres SQs anteriors, el SQ s'uneix covalentment a la fase estacionària mitjançant un grup aminopropil que s'introdueix prèviament sobre la matriu de sílice gel per reacció amb trietoxi 3-aminopropil silà.

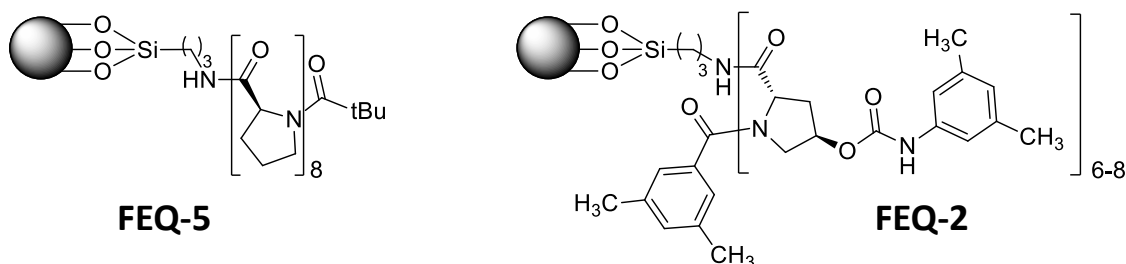


Figura 5.1. Fases estacionàries quirals resultants de la unió covalent dels SQs (SQ5 i SQ2) a un suport de sílice particulada.

Entre els SQs tipus oligoprolina substituïts i no substituïts trobem un cert nombre de diferències. La síntesi de **SQ5** presenta avantatges respecte al seu anàleg substituït. Mentre que **SQ2** es va preparar mitjançant una síntesi SPPS tipus Boc i l'aproximació triada per fer-ho requereix d'un *linker* d'estructura elaborada i síntesi tediosa, **SQ5** es prepara mitjançant un procediment SPPS de síntesi Fmoc en el que el linker, convencional, es troba unit a la resina comercial de base [113]. A més a més, part del procés de síntesi de **SQ5** es pot escalar i ser automatitzat. Tot això comporta un menor temps de preparació, una producció significativament major en cada lot, així com un estalvi considerable en reactius i dissolvents. Tanmateix, la síntesi d'aquest material en grans quantitats ha resultat un factor limitant a l'hora d'abordar la utilització del SQ en tecnologies com la cromatografia de repartiment centrífug (CPC) o cromatografia en contracorrent, en la que el nostre grup disposa d'una més que considerable experiència en la seva aplicació a la separació d'enantiòmers. Per aquest motiu es va abordar la síntesi del pèptid per polimerització de l'aminoàcid tal com es descriu a l'annex.

Així mateix, la puresa de l'octapèptid de prolina obtingut a través del procés SPPS en el cas del **SQ5** és superior al 95%. Mentre que pels SQs substituït s'obté principalment una mescla dels derivats peptídics de 6, 7 i 8 unitats del monòmer, fruit d'acoblements incomplets produïts durant el procés sintètic. De fet, el **SQ2** està format per un 34% d'octapèptid, un 50% d'heptapèptid, mentre que el **SQ4** (també substituït) està format per un 60% per octaprolina i 32% d'heptaprolina [91].

No obstant, la major diferència entre el **SQ5** i els ja estudiats rau en el fet que aquest no conté un grup 3,5-dimetilfenilcarbammat en la posició 4 de cada anell de pirrolidina, així com tampoc el grup 3,5-dimetilbenzoil en l'extrem amino terminal. L'absència d'aquests grups aromàtics es tradueix a un menor apantallament dels grups carbonil de la cadena principal que poden interaccionar més fàcilment amb grups donadors d'enllaços d'hidrogen.

5.3. Comparació cromatogràfica entre FEQ-5 i FEQ-2

L'avaluació de l'activitat enantioselectiva de **FEQ-5** es va realitzar utilitzant una sèrie de compostos racèmics estàndard, de diferents característiques estructurals i prèviament emprats en estudis anteriors [87,91]. Es van utilitzar mescles d'heptà/2-PrOH com a fase mòbil. Els resultats es van comparar amb aquells obtinguts per **FEQ-2** (Figura 5.1).

A partir dels resultats obtinguts s'observen una sèrie de trets en comú i d'altres diferencials entre **FEQ-5** i **FEQ-2**. El comportament cromatogràfic de les FEQs permet

plantejar una hipòtesi inicial del mecanisme d'enantioreconeixement per a cada un dels dos SQs.

Característiques en comú:

- Tots els analits separats contenen grups donadors de ponts d'hidrogen.
- Cap analit sense un grup donador de ponts d'hidrogen es pot separar.
- El centre estereogènic es troba a prop del grup aromàtic.
- L'ordre d'elució dels enantiòmers és el mateix.

Característiques diferencials:

- Els factors de separació són sensiblement més elevats per **FEQ-5**.
- **FEQ-5** separa un rang d'analits lleugerament més ampli.
- Els analits amb grups electroatraients són resolts més fàcilment per **FEQ-2**.
- **FEQ-5** és capaç de resoldre un major nombre d'analits.

Per tant, es podria afirmar que el mecanisme d'enantioreconeixement de **FEQ-5** es basa principalment en les interaccions de pont d'hidrogen entre els grups carbonil de la cadena principal del pèptid que constitueix el **SQ** i l'analit. En canvi, en el mecanisme de **FEQ-2** no només actuen aquest tipus d'interaccions, sinó que cal considerar també les interaccions electròniques tipus π - π que es poden establir entre dues entitats químiques de diferent densitat electrònica (SQ electrodonador, analit electroatraient). A més a més, cal remarcar que la possibilitat d'establir ponts d'hidrogen entre el **SQ2** i l'analit es veuria afectada pels grups dimetifenilcarbamats que dificultarien per impediment estèric l'accés de l'analit als grups carbonil implicats en aquest tipus d'interaccions. Per tant, tot sembla indicar que la presència d'un centre estereogènic addicional en cada unitat de prolina en **SQ2** no es tradueix en una millor capacitat enantioselectiva.

5.4. La importància de la fase mòbil [113]

En condicions convencionals, **FEQ-5** demostra capacitat per resoldre un ventall d'analits més ampli que **FEQ-2** amb factors de separació sensiblement superiors. No obstant, aquesta darrera separa millor aquells analits que contenen grups dinitrofenil. Aquest fet és l'esperat ja que el SQ que conté diversos grups dimetilfenil (electrodonadors) pot establir interaccions tipus π - π amb els diferents analits que contenen grups dinitrofenil (π -acceptors).

En estudis anteriors ja s'havia observat que l'ús de condicions de fase reversa per les FEQs derivades de la poliprolina originava una reducció dràstica de la enantioselectivitat. R. Sancho i C. Minguillón [87] van descriure que **FEQ-2** permet un inici de separació dels enantiòmers d'alguns analits quan s'empren mescles de ACN/Aigua i MeOH/Aigua com a fase mòbil. Aquest fet s'atribueix al caràcter pròtic i polar d'aquests dissolvents. L'excés de donadors de protons en el medi provoca una competència entre les molècules de dissolvent i les de l'analit per tal d'interaccionar amb el SQ [98,99], fet que dificulta l'enantioreconeixement en el que hi intervenen interaccions per pont d'hidrogen. Tot i ser aquest un fet general en les FEQs amb SQs de baix pes molecular, resulta en aquest cas significatiu que encara es mantingui uns certs inicis d'enantioseparació. La qual cosa ja sembla indicar que amb els SQs de poliprolina ens trobem front a un tipus de FEQs diferent dels estudiats fins ara.

Per tant, seguint el mateix raonament anterior, l'ús de fases mòbils apròtiques hauria de resultar en una capacitat enantioselectiva millorada ja que no hi hauria competència entre els enllaços d'hidrogen establerts entre el grup donador de protons de l'analit i els carbonils receptors de l'estructura d'oligoprolina. No obstant, els resultats observats no indiquen aquest fet. En primer lloc, quan s'utilitzen mescles heptà/MTBE, és a dir, mescles de dissolvents apròtics no halogenats, s'obtenen uns valors de resolució semblants als obtinguts en condicions convencionals (heptà/2-PrOH). De fet, els valors d'enantioselectivitat són lleugerament superiors, però els pics són asimètrics (presenten cua), i això es tradueix en una resolució inferior a la que resultaria de ser els pic simètrics. Degut al voluminós grup *tert*-butil del MTBE, la seva capacitat de solvatació és força menor que la d'altres dissolvents, i conseqüentment, això pot afavorir una major interacció dels analits amb la FEQ. Per tant, per una banda aquesta major interacció es pot traduir en un augment de l'enantioselectivitat (interacció específica analit-SQ), però també pot comportar interaccions inespecífiques amb la fase estacionària que originen les cues dels pic.

Una reducció radical de l'enantioselectivitat s'observa quan s'utilitzen dissolvents clorats en la fase mòbil, tot i ser aquests apròtics. Els valors dels factors de separació (α) de **FEQ-5** quan s'utilitzen fases mòbils tipus CHCl_3 o DCM/heptà són molt pròxims a

1,00. En canvi, els valors de **FEQ-2**, tot i que disminueixen considerablement són lleugerament superiors als de **FEQ-5**, la qual cosa s'atribueix a les interaccions electròniques tipus π - π entre selector quirals i analits.

Aquests resultats es poden relacionar amb els càlculs computacionals realitzats per Ashtari i Cann [99] que expliquen com les cadenes relativament llargues de poliprolina (6 aminoàcids) presenten un número menor de confòrmers en ambients més polars i pròtics. Els ambients més apolars condueixen a una estructura més desordenada (major variabilitat poblacional de confòrmers). La situació òptima es produiria quan la poliprolina es troba immersa en mescles alcà/2-PrOH situació en la que es calcula que només un 20% dels grups carbonil forma ponts d'hidrogen amb els dissolvents. Aquestes interaccions confereixen rigidesa a l'estructura sense arribar a saturar els llocs d'interacció SQ/analit.

Experimentalment es demostra que la pèrdua d'enantioselectivitat és reversible [113]. Aquesta es recupera quan s'afegeix una petita proporció de 2-PrOH a la fase mòbil (1-2%). De fet, aquest procés de recuperació de l'enantioselectivitat presenta la peculiaritat ser significativament més ràpid que la pèrdua d'enantioselectivitat. Aquesta observació resulta un tant inesperada ja que la transició d'una població de confòrmers diversos i flexibles a una única estructura rígida caldria esperar que no fos un procés afavorit entròpicament. Assumint que no hi ha un canvi entàlpic important, ja que no es formen/trenquen enllaços en produir-se el canvi conformacional, cal explicar l'avantatge entròpic del procés en base a la solvatació per part del dissolvent en cada cas. El resultat de l'estudi del procés de canvi conformacional concorda amb els resultats dels experiments espectroscòpics realitzats pel grup del Dr. Li [93] en sistemes líquids DCM/2-PrOH.

5.5. Materials monolítics com a noves fases estacionàries [114,115]

Entre d'altres propietats dels monòlits utilitzats com a fases estacionàries cromatogràfiques, s'ha de destacar l'alta permeabilitat d'aquest materials que provoca que la caiguda de pressió a la columna sigui molt baixa. Aquest fet permet l'ús de fluxos de fase mòbil més alts i així es pot reduir el temps d'anàlisi. Altres avantatges associats a les columnes monolítiques són la productivitat i eficiència, la versatilitat en la modificació de la superfície i la facilitat de preparació. En aquest sentit, en la present tesi doctoral s'ha descrit derivatització quirals covalent de columnes monolítiques comercials per a convertir-les en FEQs.

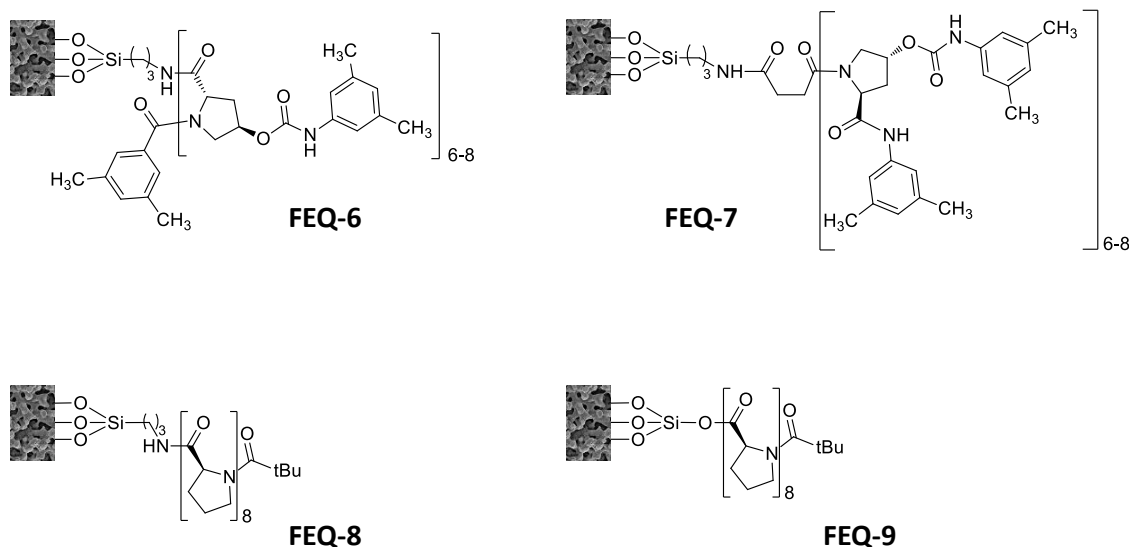


Figura 5.2. Fases estacionàries quirals monolítiques: **FEQ-6**, **FEQ-7**, **FEQ-8**, **FEQ-9**.

En la tesi doctoral es descriu un procediment de modificació de la columna *in situ*, mitjançant l'ús d'una bomba de xeringa. Aquesta metodologia permet la introducció sobre el monòlit de sílice, en primer lloc, del grup espaïador aminopropil, i posteriorment, del SQ desitjat. El grau de derivatització s'ha controlat considerant la diferència de massa de la columna, abans i després de la derivatització. En cas de creure-ho convenient, es pot continuar la derivatització per tal d'incrementar la quantitat de SQ ancorat sobre el monòlit. Finalment, es pot realitzar un tractament d'*end-capping* per tal de derivatitzar els possibles grups silanol remanents. Aquest mètode ha resultat ser senzill, eficient i aplicable a tots els SQs de la família dels derivats de poliprolina (Figura 5.2).

5.5.1. Avaluació de l'eficiència i la permeabilitat de les columnes monolítiques

Es va poder comprovar com, malgrat l'elevat grau de derivatització, la introducció del SQ té un efecte molt petit sobre l'eficiència, sobretot quan es treballa a fluxos elevats (Figura 5.3). Aquesta observació resulta interessant si es té en compte la dificultat que presenta l'empaquetament de columnes particulades amb un elevat grau de material orgànic de derivatització sobre la matriu de sílice. A més, els valors d'eficiència obtinguts per les fases monolítiques són millors que aquells obtinguts per la respectiva FEQ particulada (Figura 5.3).

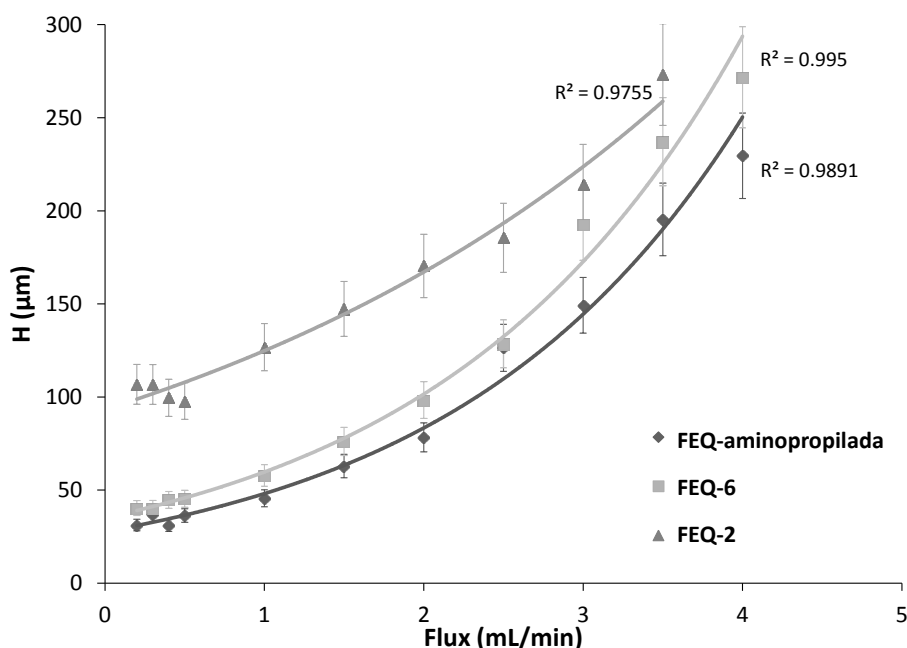


Figura 5.3. Variació de l'altura de plat teòric en funció del flux aplicat per 3 fases estacionàries, de les quals **FEQ-2** és particulada i **FEQ-aminopropilada** i **FEQ-6** són monolítiques.

Pel que fa al comportament cromatogràfic, els estudis comparatius es van realitzar amb un conjunt de racèmics molt similar al usat en els estudis anteriors amb FEQs particulades [87,91,113]. Per **FEQ-6** i **FEQ-7**, que contenen un SQ polisubstituït, es va observar un patró de retenció semblant al que s'ha descrit per les seves respectives anàlogues particulades, **FEQ-2** i **FEQ-4** [114]. Així doncs, aquestes FEQs retenen bàsicament els analits amb anells aromàtics π -deficients degut a les interaccions complementàries tipus π - π . En canvi, pels altres analits no s'observa gairebé retenció. D'altra banda, el patró de retenció de les FEQs que contenen octaprolina no substituïda com a SQ (**FEQ-8** i **FEQ-9**) és diferent de l'anterior [115]. Aquestes columnes retenen els analits que contenen un grup donador d'enllaços d'hidrogen, de la mateixa manera que ho fa la seva anàloga particulada **FEQ-5**.

Quant a l'enantioselectivitat, les FEQs monolítiques substituïdes poden separar no només aquells analits que contenen grups dinitrobenzoil, sinó també aquells amb grups donadors de ponts d'hidrogen. S'observa com a excepció a aquest línia general, la separació d'un derivat del binaftil (Figura 5.4.a) que, malgrat no disposar de grups donadors de pont d'hidrogen, se'n poden resoldre el enantiòmers. També cal destacar que l'enantioselectivitat observada en aquestes fases és superior a la de les FEQs particulades anàlogues.

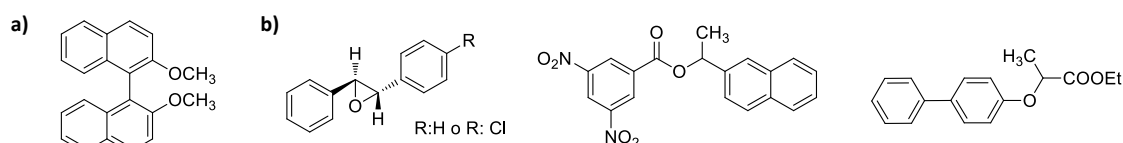


Figura 5.4. Compostos racèmics que no contenen un grup donador d'enllaços per ponts d'hidrogen separats per a) **FEQ-6** i **FEQ-8** i b) només **FEQ-8**.

D'altra banda, la columna monolítica no substituïda (**FEQ-8**) origina factors de separació clarament superiors a aquells obtinguts amb **FEQ-5**. També mostra valors de resolució més alts i separa un rang més ampli d'analits. De fet, alguns analits sense grups donadors d'enllaços d'hidrogen es poden separar parcial o totalment amb aquesta FEQ (Figura 5.4.b).

5.5.2. Dependència del comportament cromatogràfic del contingut de selector quiral

Encara que la superfície específica sigui similar pel format monolític o el que tenen les partícules de sílice (300-320 m²/g, segons les dades del fabricant), el primer presenta un major ancoratge de matèria orgànica. És a dir, es pot assolir un grau de derivatització major de SQ. Tant és així, que propietats cromatogràfiques com l'enantioselectivitat (Taula 5.1), i conseqüentment la resolució, es veuen directament incrementades quan major és la quantitat de SQ de cada columna.

Taula 5.1. Sumari del contingut de SQ per les FEQs emprades i resultats de la seva capacitat d'enantioselectió.

FEQ	FEQ-2	FEQ-4	FEQ-5	FEQ-6	FEQ-7	FEQ-8	FEQ-9
CSP	CSP-2 ^a	CSP-2 ^b	CSP-1 ^c	CSP-1 ^d	CSP-2 ^d	CSP-1 ^e	CSP-3 ^e
µm SQ/columna	25,1 ^b	33,2 ^b	188,6 ^e	91,5 ^d	57,8 ^d	449,8 ^e	265,5 ^e
α per I	1,23 ¹	1,68	2,31	1,68 ²	1,88	3,51	3,87
α per II	1,00 ¹	1,04 ¹	1,15	1,15 ²	1,03	1,40	n.d.
Analits separats	8/25	10/21	15/29	13/21	11/21	21/29	n.d.

On a) [87], b) [91], c) [113], d) [114] i e) [115]. Les condicions cromatogràfiques són heptà/2-PrOH (90:10) a F=1 mL/min, a excepció de 1) heptà/2-PrOH (98:2), F=1 mL/min i 2) heptà/2-PrOH (70:30), F=0,5 mL/min.

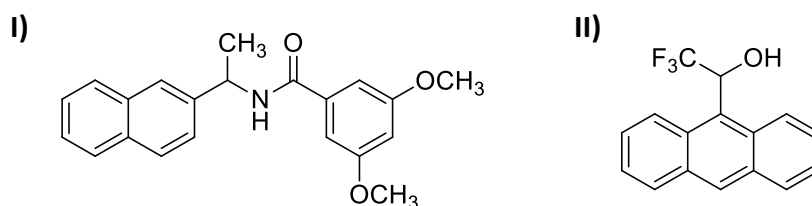


Figura 5.5. Compostos I i II de la Taula 5.1.

Considerant els valors anteriors, es reconeixen dues tendències: i) en termes generals, com més SQ conté la FEQ, major és el factor de separació (α) per l'analit I, ii) aquelles FEQs amb un grau de derivatització més elevat, són capaces de resoldre una proporció més alta d'analits. A aquest respecte, cal tenir en compte la diferencia en mida molecular dels SQs que aquí s'estan comparant.

Mentre que **SQ2** (PM promig: 2123,66 g/mol) i **SQ4** (PM promig: 2236,23 g/mol) són notablement voluminosos, **SQ5** (PM: 879,05 g/mol) és d'una mida força menor. Per consegüent, és més difícil enllaçar una quantitat molar superior dels selectors voluminosos independentment de quin sigui el format de la matriu. La qual cosa explicaria, al menys parcialment les diferències de derivatització (Figura 5.6).

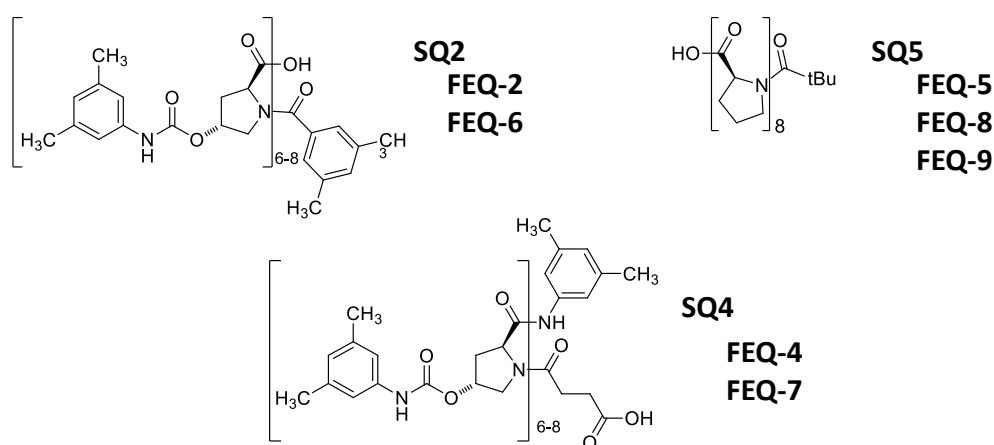


Figura 5.6. Estructures químiques dels **SQ2**, **SQ4** i **SQ5** i les FEQs en les quals es troben enllaçats.

5.5.3. Dependència del comportament cromatogràfic de la matriu cromatogràfica

A la Taula 5.1. es pot observar també un efecte atribuïble al format de la matriu. En general, les FEQs monolítiques presenten valors d'enantioselectivitat majors així com també un rang d'analits separables més ampli. Aquest fet pot atribuir-se a la disponibilitat del SQ ancorat sobre el monòlit. Així l'accessibilitat del SQ per l'analit seria més alta en el cas de les FEQs monolítiques que en les respectives FEQs anàlogues de matriu particulada. De fet el contingut de **SQ5** en **FEQ-9** és només 1,4 vegades major que en **FEQ-5**. En canvi, els valors d'enantioselectivitat són considerablement més alts en la primera, en una magnitud que supera la relació molar de contingut de selector entre elles (Figura 5.7).

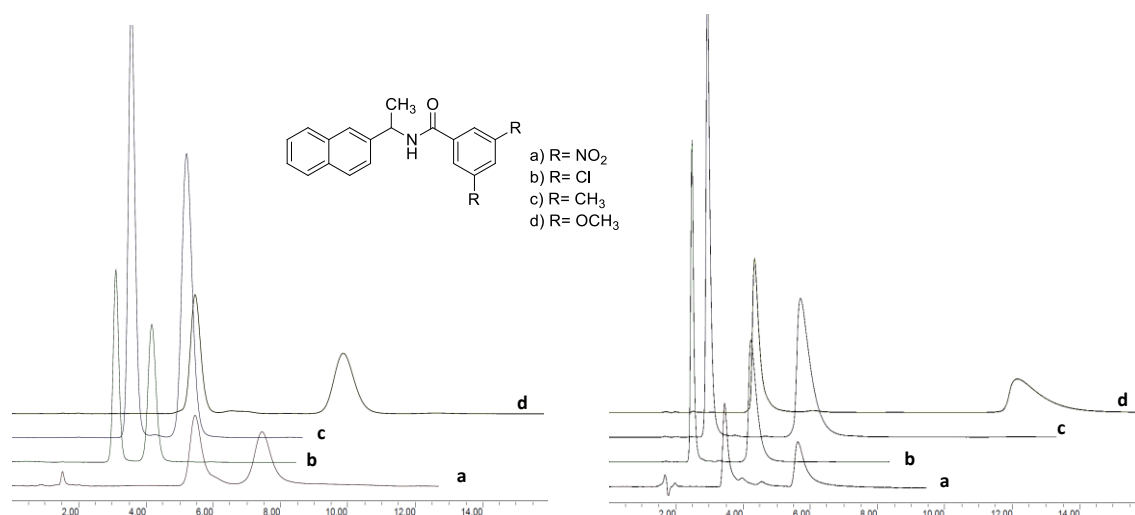


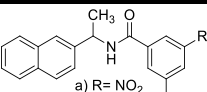
Figura 5.7. Cromatogrames obtinguts per la **FEQ-5** Estructures químiques dels **SQ2**, **SQ4** i **SQ5** i les FEQs en les quals es troben enllaçats.

A més a més, com ja s'ha comentat anteriorment (apartat 5.5.1 i Figura 5.3) les FEQs de matriu monolítica són més eficients que les seves anàlogues particulades. Aleshores, considerant la expressió de la resolució:

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k}{k + 1} \right)$$

A valors de factors de capacitat semblants i de factors de separació lleugerament superiors, una major eficiència comporta una notablement major resolució, fet que es demostra per alguns analits en les diferents fases estacionàries (Taula 5.2).

Table 5.2. Paràmetres cromatogràfics obtinguts utilitzant com a fase mòbil heptà/2-PrOH (90:10) a F=1 mL/min

Compostos racèmics		FEQ-8				FEQ-5			
		k_1	α	N_1	R_s	k_1	α	N_1	R_s
 a) R= NO ₂ b) R= Cl c) R= CH ₃ d) R= OCH ₃	a	3,61	2,47	2766	9,38	2,41	1,65	440	1,87
	d	1,22	2,61	5305	10,72	1,13	1,86	1187	3,16
	c	1,33	3,31	4397	11,92	1,72	1,98	961	3,70
	d	2,98	3,51	2708	12,66	2,57	2,31	906	4,61

5.5.4. Capacitat de càrrega

Una de les característiques més interessants que ofereixen les fases estacionàries monolítiques és la seva alta capacitat de càrrega (apartats 5.2 [114] i 5.3 [115]). Aquesta propietat és fonamental si es vol considerar l'aplicació preparativa dels materials estudiats. D'entre les fases estacionàries quirals estudiades, aquelles que posseeixen una capacitat de càrrega més elevada són **FEQ-6** i **FEQ-8**. Cal indicar que

també l'enantioselectivitat juga un rol important, ja que quan aquesta és més gran, més elevada és també la quantitat d'analit que es pot resoldre. Per això, **FEQ-6** que conté **SQ2** (oligoprolina polisubstituída) ofereix una capacitat de càrrega major pels analits amb anells electroatracants, mentre que **FEQ-8** mostra una capacitat de càrrega més elevada per la resta d'analits.

Com s'ha mencionat en l'apartat 5.3 [115], la capacitat de càrrega més elevada s'observa per l'analit **d** (Taula 5.2) sobre **FEQ-8**. A més a més, si es té en compte la relació molar entre analit resolt i SQ enllaçat a la matriu cromatogràfica ($n_{\text{analit}}/n_{\text{SQ}}$), **FEQ-8** segueix mantenint la primera posició també en aquest aspecte, mentre que la darrera del grup la ocupa la FEQ **FEQ-5** (particulada). Aquest fet es pot considerar una indicació de que la capacitat de càrrega elevada que presenten les FEQs de format monolític no només es deu a un contingut més alt de SQ, sinó que es fa evident el paper que s'atribueix a la major disponibilitat de SQ.

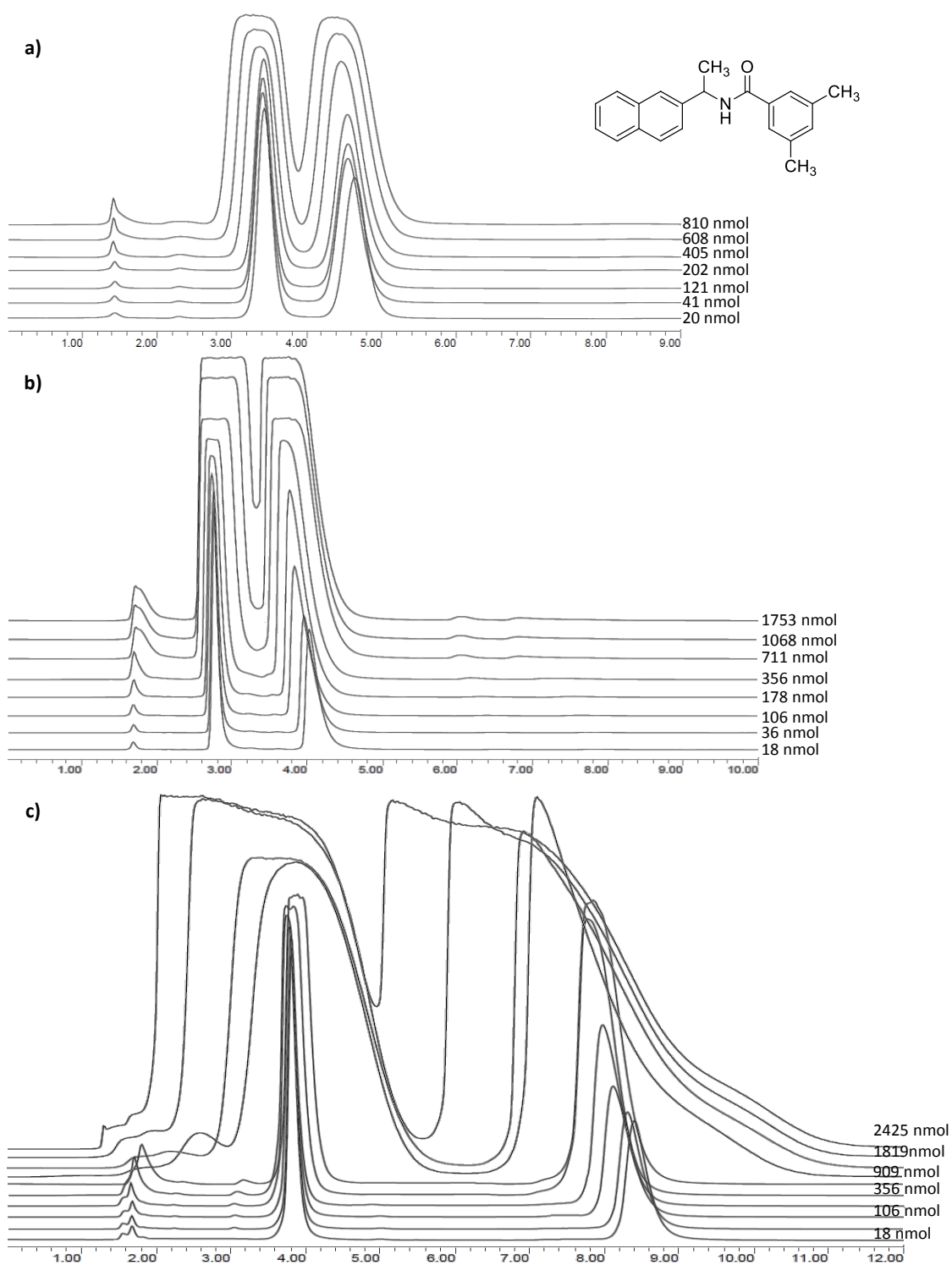


Figura 5.8. Comparació de la capacitat de càrrega per l'analit indicat (part superior-dreta), utilitzant a) FEQ-5 b) FEQ-9 i c) FEQ-8. Condicions cromatogràfiques: Heptà/2-PrOH (90:10), flux: 1 mL/min, $\lambda=254$ nm.

5.6. Aplicació de les condicions de cromatografia de fluids supercrítics (SFC) a les FEQs de la família de les oligoprolines [116]

Les propietats intrínseques de les fases mòbils supercrítics, és a dir, la baixa viscositat i l'alta capacitat de difusió d'aquests fluids permeten treballar en condicions de flux alts, incrementant així la capacitat "high-throughput".

Atès que no es coneixien precedents de la utilització de les condicions de SFC ni amb FEQs de la família de les oligoprolines ni amb columnes monolítiques, es van escollir quatre columnes diferents (Figura 5.9) per tal de valorar tant el format de la matriu cromatogràfica com el SQ que contenen.

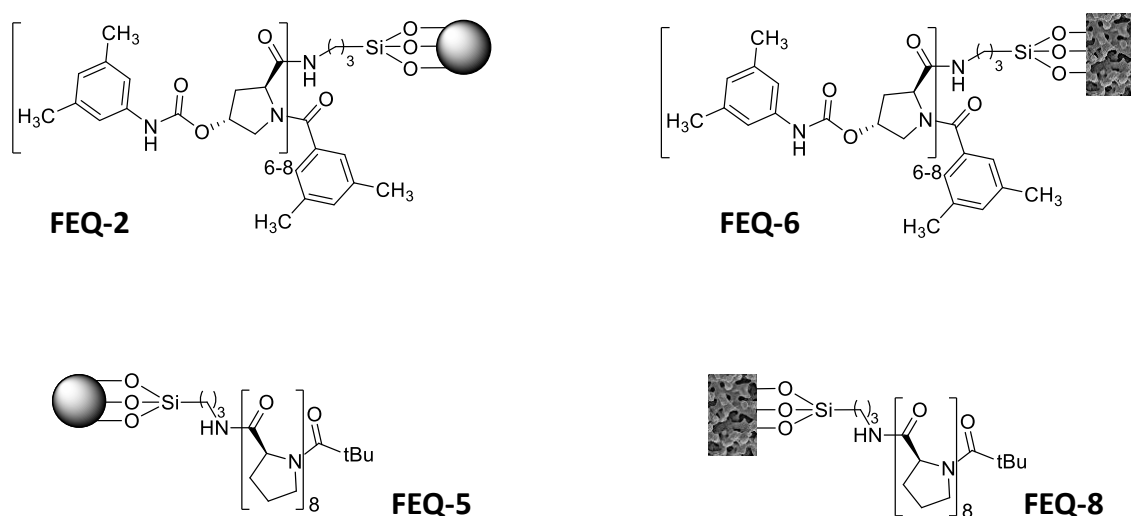


Figura 5.9. FEQs utilitzades en l'estudi aplicant cromatografia de fluids supercrítics.

Els resultats obtinguts van permetre demostrar que, de la mateixa manera que passa en cromatografia de fase normal, l'enantioselectivitat d'aquestes fases estacionàries gairebé desapareix al utilitzar dissolvents clorats en la fase mòbil. Aquest fet corrobora tan el mecanisme d'enantioselectió com la teoria de la pèrdua reversible d'enantioselectivitat descrita en el capítol IV. No obstant, degut a la major difusió del diclorometà en condicions supercrítics (CO₂:DCM (70/30), T=35°C, P_{sortida}=140 barr), la pèrdua de l'enantioselectivitat és molt més ràpida, donant-se just en el temps d'equilibrat. De la mateixa manera, la recuperació de la capacitat enantioselectiva es produeix també ràpidament, la qual cosa impedeix estudiar el fenomen de la manera que es va poder fer en HPLC.

Aquesta major difusió i major velocitat del flux també tenen un impacte clar en els valors cromatogràfics. Per exemple, l'eficiència obtinguda en condicions supercrítics és més gran que la que correspon a condicions de fase normal. Aquelles columnes que presenten matrius cromatogràfiques tipus monòlit presenten valors d'altura de plat

teòric (H) menors que les corresponents anàlogues particulades, sobretot quan es treballa utilitzant EtOH com a solvent. Per altra banda, els valors de resolució són del mateix ordre o inclús lleugerament majors a aquells obtinguts en NP-HPLC, encara que quan s'aplica CO_2/EtOH s'observa una disminució d'aquesta. Per consegüent, les majors eficiències i resolucions en condicions supercrítiques i amb suports monolítics poden ser el resultat d'una actuació sinèrgica entre aquests dos factors.

No obstant, l'avantatge que es va demostrar més significatiu de treballar en condicions de SFC és la disminució del temps d'anàlisi. El temps total del cromatograma per tots els analits provats en les diferents columnes, va resultar ser clarament més curt en condicions de cromatografia supercrítica que en condicions de cromatografia líquida convencional. Tant és així, que els valors mitjans de temps d'anàlisi quan s'utilitza $\text{CO}_2/2\text{-PrOH}$ (90:10) són de l'ordre de la meitat del temps d'anàlisi promig en condicions de fase normal, relació que encara es pot reduir fins a una quarta part quan s'utilitza EtOH com a modificador de la polaritat.

CONCLUSIONS

Conclusions

A partir del treball realitzat en la present tesi doctoral s'han extret les següents conclusions:

1.- El procediment de síntesi en fase sòlida del pèptid octaprolina a través d'una aproximació Fmoc que hem aplicat ha resultat adient per a ser escalat i automatitzat. Amb aquest procediment s'han pogut obtenir lots d'aproximadament 2 grams de pèptid amb una puresa superior al 95% sense deleccions detectables.

2.- De la comparació cromatogràfica de les FEQs de matriu particulada que contenen els SQs d'oligoprolina substituïda o no (**FEQ-2** i **FEQ-5**) es va poder concloure que la presència dels anells aromàtics en la primera només resulta d'interès en la separació dels enantiòmers d'analits proveïts d'anells de densitat electrònica inversa a la del substituent. En condicions convencionals de fase normal, la FEQ amb el SQ no substituït (**FEQ-5**) origina factors de separació més elevats i és capaç de resoldre un rang d'analits més ampli. Això suggereix que el mecanisme d'enantioselecció per **FEQ-5** es basa majoritàriament en l'establiment d'interaccions per pont d'hidrogen entre SQ i analit. La major enantioselectivitat de **FEQ-5** s'atribuiria a l'accessibilitat incrementada pels grups carbonil dels enllaços peptídics en l'esquelet d'oligoprolina respecte al SQ substituït.

3.- La dependència entre l'enantioselectivitat de la FEQ i la fase mòbil utilitzada s'ha demostrat ser produïda per canvis conformacionals reversibles en el SQ: Per **FEQ-5**, s'observa una disminució molt dràstica d'enantioselectivitat en utilitzar fases mòbils que contenen dissolvents clorats que es recupera en introduir solvents donadors de pont d'hidrogen en la mescla. Aquest efecte s'atribueix al desordre conformacional i l'increment de flexibilitat quan el SQ es troba immers en aquests medis.

4.- Amb la preparació *in situ* de FEQs de matriu monolítica, preparades realitzant la reacció de derivatització en el sí de la columna, s'han pogut unir en un mateix material les propietats de dinàmica de fluids aportades pel monòlit amb les característiques d'enantioselectivitat i capacitat de càrrega del SQ. Els materials resultants permeten la utilització de fluxos de fase mòbil elevats i presenten una capacitat de càrrega incrementada respecte a les FEQs anàlogues de matriu particulada.

5.- Encara que les matrius monolítiques tenen una àrea específica del mateix ordre que les seves anàlogues particulades, les primeres permeten un major ancoratge de SQ. Això comporta una retenció major dels analits, millors valors d'enantioselectivitat i capacitat de càrrega sense que s'afecti el pas de fase mòbil al seu través.

6.- En les columnes monolítiques s'ha pogut determinar l'existència d'una relació lineal entre enantioselectivitat i quantitat de SQ que contenen.

7.- Les columnes monolítiques permeten la resolució de quantitats de racèmic fins a 5 vegades més grans, en funció de l'analit considerat, que les que resolen les FEQs anàlogues de matriu particulada. Aquesta característica suggereix que les FEQs monolítiques són bones candidates per tal de ser usades en cromatografia semi/preparativa.

8.- Les millores observades per les FEQs monolítiques respecte a les de matriu particulada no es poden explicar únicament en base al diferent contingut en SQ. S'ha proposat que podria haver un efecte atribuïble al format de la matriu, tant pel que fa a l'enantioselectivitat (FEQs monolítiques més enantioselectives i amb un camp d'aplicació lleugerament més ampli que les corresponents particulades) com a la capacitat de càrrega (increment de capacitat de càrrega inclús per FEQ de contingut semblant en SQ). Així el format monòlit podria permetre una millor disponibilitat del SQ que seria més accessible als analits que no pas en FEQs de matriu particulada.

9.- Considerant aplicacions analítiques, l'alta permeabilitat dels monòlits permet incrementar els fluxos de fase mòbil sense repercutir seriosament en la resolució. Així es poden reduir considerablement els temps totals d'anàlisi i treballar amb condicions *high-throughput*.

10.- La utilització de condicions SFC ha permès determinar quin és l'efecte d'aquestes condicions sobre la conformació del SQ. Així, si bé el SQ manté la conformació enantioselectiva en presència de CO₂ addicionat d'un alcohol (2-PrOH o EtOH) com a modificador de la polaritat, la presència de diclorometà com a modificador de polaritat anul·la l'enantioselectivitat, de manera anàloga al que succeeix en condicions de NP-HPLC. En aquest sentit, quan s'utilitza 2-PrOH com a modificador de la polaritat, l'enantioselectivitat obtinguda és del mateix ordre o lleugerament superior a l'obtinguda amb condicions de fase normal. En canvi, en emprar EtOH com a co-solvent aquesta enantioselectivitat disminueix lleugerament.

11.- L'ús de condicions de cromatografia supercrítica sobre les FEQs estudiades permeten reduir el temps d'anàlisi. Aquest és el principal avantatge d'aquesta tècnica ja que permet una reducció del cromatograma fins a una quarta part d'aquell obtingut en condicions de NP-HPLC.

ANNEX I

POLIMERITZACIÓ DE LA L-PROLINA

Polimerització de L-Prolina

7.1. Aspectes generals

7.1.1. Antecedents

Els diferents SQs presentats en la present tesi doctoral es van sintetitzar utilitzant tècniques de síntesi de pèptids en fase sòlida (SPPS). D'acord amb els resultats obtinguts, es pot concloure que aquest mètode presenta una sèrie d'avantatges, ja que permet el control de cada acoblament i així poder obtenir polímers de prolina d'una llargada determinada (8 unitats de prolil en el nostre cas), evitant la polidispersió. A més a més, el procediment permet la inserció del grup terminal que es cregui més adequat.

En la síntesi peptídica en fase sòlida de tipus Boc realitzada manualment, la quantitat de SQ obtingut per lot era de l'ordre dels 100 mg. El procediment utilitzat amb el SQ no substituït, una síntesi tipus *Fmoc*, emprant una resina de 2-clorotritil (veure apartat 4.1. [113]) va permetre, un cop escalat i automatitzat utilitzant un sintetitzador automàtic, l'obtenció de fins a 2 grams de SQ per lot.

No obstant, la síntesi del SQ no deixava de ser el coll d'ampolla per tal de poder disposar de quantitats considerables de cadenes de poliprolina relativament curtes, per tal de procedir a l'estudi de la seva enantioselectivitat en diferents condicions. Concretament, en un projecte inicial de la present tesi doctoral ens plantejàvem estudiar el comportament enantioselectiu dels SQs d'oligoprolina en cromatografia en contracorrent, una tècnica de cromatografia líquid-líquid en la que el nostre grup de recerca posseeix una notable experiència. En aquest context s'emmarca també l'estada realitzada al laboratori del Brunel Institute of Bioengineering (BIB) de la Brunel University (Uxbridge, Londres, Regne Unit). Per aquesta raó, en un cert moment es va decidir estudiar l'aplicabilitat d'altres procediments de síntesi que permetessin arribar a quantitats considerablement elevades d'oligopèptids.

Per una banda, es va assajar reproduir el treball de Li i col·laboradors [117], realitzant un procediment convencional de síntesi en dissolució (Figura 7.1). No obstant, ben aviat va quedar clar que ni el rendiment de les successives reaccions ni les etapes de purificació dels intermedis ens haurien de permetre arribar fàcilment a l'obtenció del SQ desitjat. El procediment permetia amb dificultat arribar a obtenir cadenes de quatre unitats de prolina.

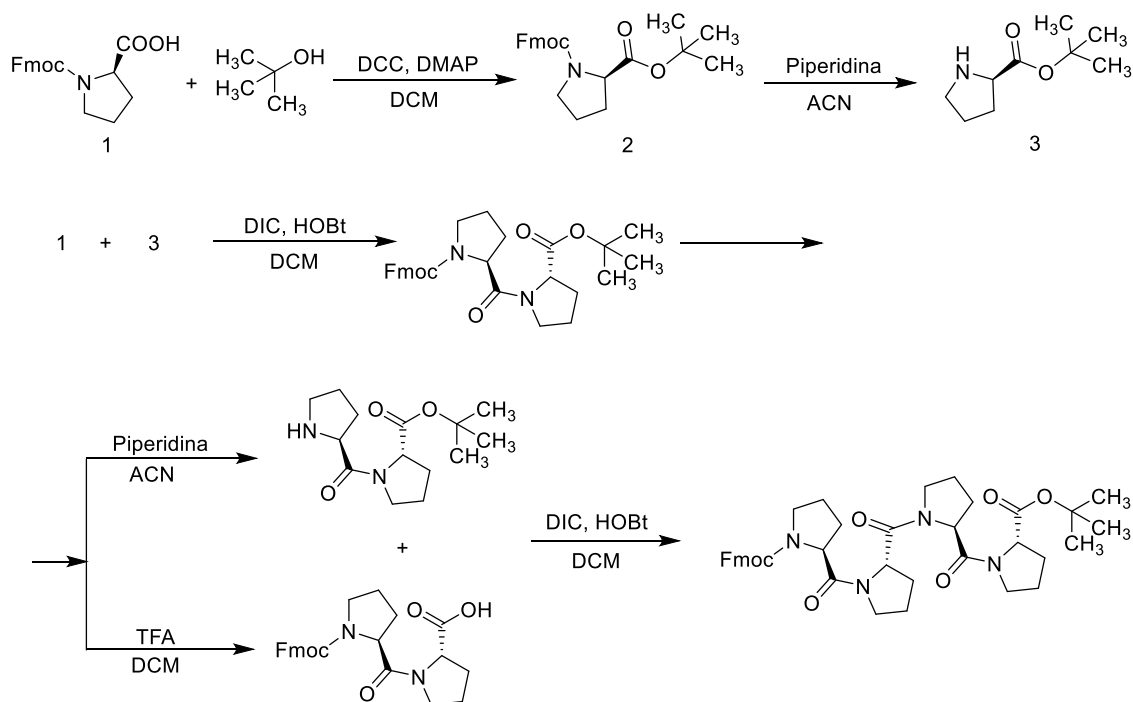


Figura 7.1. Síntesi del SQ compost per 4 unitats de prolina mitjançant una síntesi convencional en solució.

Per altra banda, es va abordar la preparació de cadenes de poliprolina per polimerització del propi aminoàcid. La recerca bibliogràfica corresponent es va conduir a dos procediments descrits: la polimerització de l'anhídrid derivat de la prolina [118] i la polimerització directa de la prolina en presència de difenilfosforazida (DPPA) [119].

En el primer cas la polimerització de l'*N*-carboxianhídrid derivat de l'aminoàcid té lloc en dues etapes [120]. La primera consisteix en realitzar en primer lloc la preparació de l'*N*-carboxianhídrid cíclic de l'aminoàcid per tractament d'aquest en trifosgè, que posteriorment es podria polimeritzar (o co-polimeritzar, si es barregen anhídrids d'aminoàcids diversos en la mateixa reacció) en el sí de dissolvents com l'acetonitril o el 1,2-dicloroetà en diverses condicions. Aquest procediment ha estat aplicat a diversos aminoàcids (Figura 7.3). No obstant, està descrit que, en el cas de l'aminoàcid prolina la formació de l'anhídrid no és espontània, sinó que cal realitzar un tractament amb una base no nucleòfila per a produir la ciclació del cloroformat intermedi (Figura 7.2).

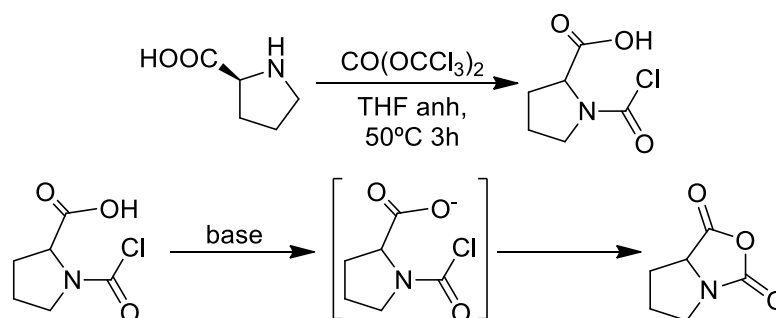


Figura 7.2. Síntesi del *N*-cloroformil derivat de L-prolina i posterior ciclació d'aquest per tractament amb una base.

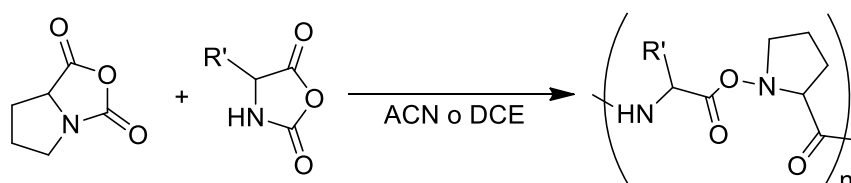


Figura 7.3. Copolimerització de l'anhídrid derivat de L-prolina amb el d'un altre aminoàcid [118].

El procediment no estava exempt d'inconvenients. L'ús de trifosgè juntament amb la descrita dificultat per eliminar l'amina utilitzada en la formació de l'anhídrid ens va fer descartar aquest procediment. L'ús de bases enllaçades a resines es va descartar degut al seu cost econòmic que faria inabastable la síntesi a una certa escala [120].

Tanmateix, la polimerització de l' α -aminoàcid en presència de difenilfosforilazida (DPPA) [119] és una reacció de policondensació directa, en la qual no es requereix la formació de cap intermedi. No obstant, la metodologia descrita en la literatura es limita a la descripció d'algunes condicions experimentals per a la polimerització i/o copolimerització de diferents aminoàcids i/o els seus èsters metílics i benzílics, condicions que haurien de determinar el grau de polimerització així com la dispersió de la mida molecular del polímer obtingut. Tampoc s'hi descriuen els procediments de purificació ni caracterització dels productes obtinguts. No obstant, es va decidir realitzar alguns assaigs de polimerització amb DPPA per tal d'avaluar la viabilitat de la reacció en la obtenció d'un pèptid de la llargària desitjada i la dispersió de la mateixa, així com de l'escalat d'aquesta reacció.

7.2. Polimerització directa de L-Prolina amb DPPA

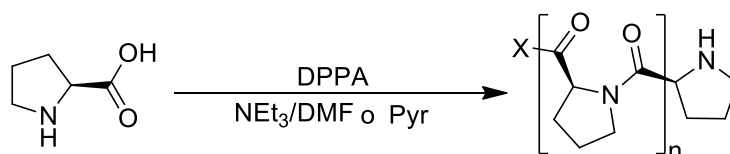


Figura 7.4. Policondensació de L-Prolina utilitzant difenilfosforilazida.

Tenint en compte el protocol descrit [119] (Figura 7.4), i per tal de determinar les condicions més adients per obtenir els compostos d'interès, es van estudiar diferents variables (Taula 7.1). Així doncs, l'α-aminoàcid L-prolina es va tractar amb DPPA en el sí de piridina (Pyr) o dimetilformamida (DMF) com a dissolvents de la reacció. En el cas d'utilitzar aquest darrer, cal també addicionar trietilamina (TEA), com a base per tal d'assistir la desprotonació inicial de l'aminoàcid. Es van realitzar també diferents assajos controlant el temps de reacció, variable que es va considerar inicialment que podria tenir la seva influència en el grau de polimerització assolit per polímer. La mescla de reacció es va mantenir sempre a una temperatura inferior a 5 °C durant la primera hora de reacció i, posteriorment, a temperatura ambient. La relació molar dels reactius va ser de 1,3 mol de DPPA i 2,3 mol de TEA en 1 mL de dissolvent. Tots els assaigs es van realitzar amb una quantitat de 0,5 g de L-prolina.

Taula 7.1. Condicions de reacció assajades en la polimerització directa de L-Prolina.

Assaig	temps (h)	Dissolvent	TEA	Massa final de polímer (mg)
1	24	Pyr	No	151
2	48	Pyr	No	225
3	120	Pyr	No	214
4	168	Pyr	No	210
5	216	Pyr	No	203
6	48	Pyr	No	250
7	48	Pyr	Sí	271
8	3	DMF	Sí	5
9	6	DMF	Sí	7
10	8,20	DMF	Sí	9
11	24	DMF	Sí	29
12	29	DMF	Sí	27
13	48	DMF	Sí	74
14	120	DMF	Sí	37
15	168	DMF	Sí	39
16	216	DMF	Sí	31

El procediment estàndard per tal d'aïllar el producte de la reacció consistí en rentats successius del cru obtingut amb èter dietílic, metanol i novament amb èter etílic. Aquest procediment general s'adaptà segons les característiques de solubilitat dels productes obtinguts.

En l'anàlisi i caracterització dels materials obtinguts es va utilitzar HPLC en fase inversa així com ressonància magnètica nuclear (RMN) i espectrometria de masses (MALDI-TOF).

7.3. Resultats i discussió

L'elecció del dissolvent orgànic per dur a terme la reacció de polimerització, ja sigui DMF o Pyr en aquest cas, respon a que els dos dissolvents són polars apròtics i permeten una alta solubilitat tant del monòmer com del polímer format. Cal tenir en compte que, en el cas del DMF, com que no té caràcter bàsic, cal afegir una amina terciària (Figura 7.5).

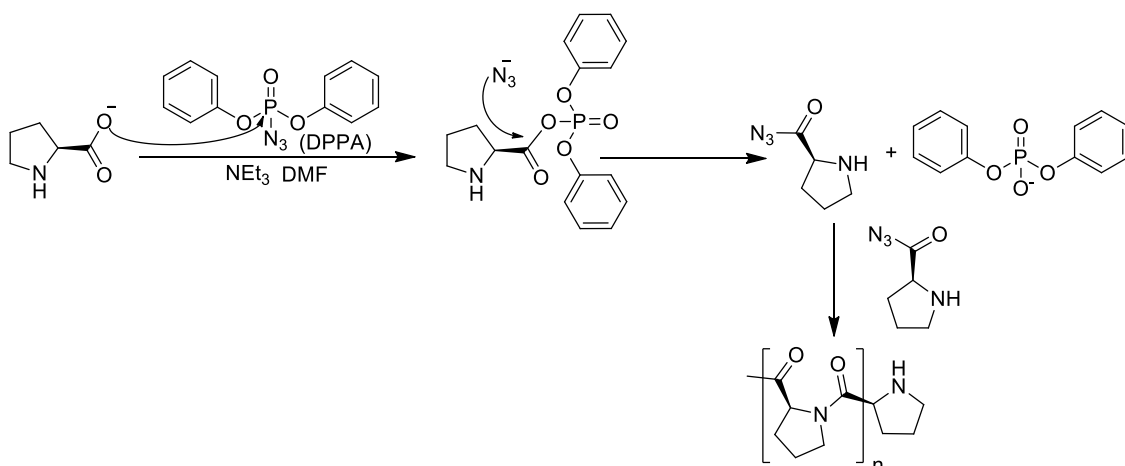


Figura 7.5. Mecanisme de la policondensació de la L-prolina utilitzant DMF com a solvent.

En canvi, en utilitzar piridina, no cal introduir una base addicional ja que el propi dissolvent fa el paper de tal (Figura 7.6).

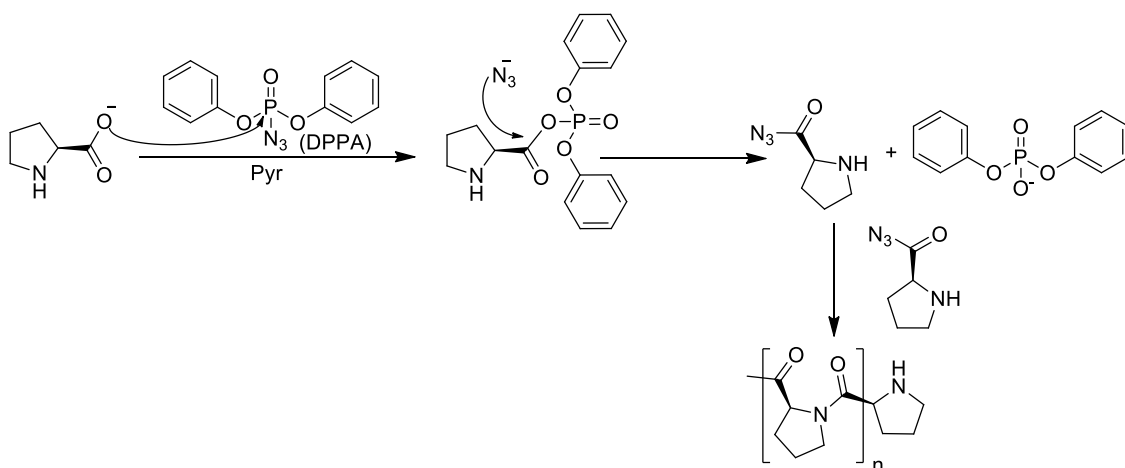


Figura 7.6. Mecanisme de la policondensació de L-prolina amb DPPA en presència de piridina.

Un cop formada d'acilazida intermèdia gràcies a l'activació del grup carboxilat inicial amb DPPA, aquest intermedi pot reaccionar de diferents maneres: i) en presència d'un altra molècula d'acilazida es pot produir la reacció entre elles, acoblant-se així un nou monòmer a l'incipient polímer. Aquesta reacció pot tenir lloc diverses vegades, la qual cosa donaria origen als pèptids desitjats. ii) a temperatures superiors als 5 °C, està descrita la formació d'isocianats, procedents de la transposició de Curtius experimentada per les acilazides (Figura 7.7). Aquesta reacció hauria de aturar el creixement de la cadena.

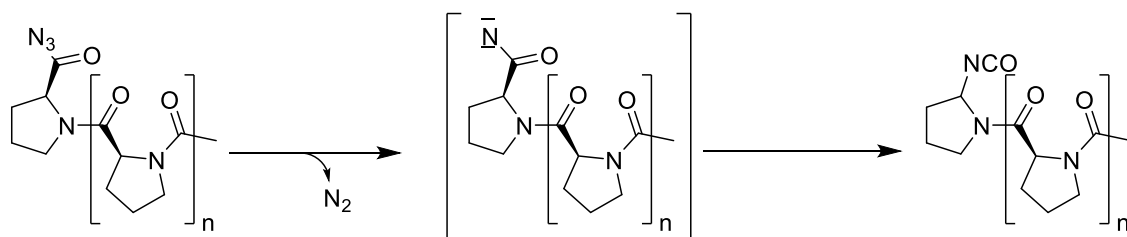


Figura 7.7. Transposició de Curtius que origina isocianats. La reacció determina el final del creixement de la cadena polipeptídica.

7.4. Intents de caracterització dels materials obtinguts

7.4.1. Massa de polímer

A la Taula 7.1 es relacionen els pesos de polímer obtinguts després del tractament de *work-up* al que es sotmet la barreja de reacció. Tal i com es pot observar, hi ha una significativa diferència segons el dissolvent utilitzat. La utilització de piridina com a dissolvent condueix, després dels rentats, a quantitats de polímer significativament més elevades que l'ús de DMF/ NEt_3 . Aquesta diferència es va relacionar amb el possible grau de derivatització del polímer assolit en la reacció. Així aquells polímers de grau de polimerització més baix s'haurien pogut eliminar durant el procés de rentat.

De la sèrie d'assaigs realitzats també es podria concloure que hi hauria un temps òptim de reacció que, tant en el cas d'utilitzar DMF com piridina com a dissolvent, es situaria a voltant de les 48 h. En aquest temps s'aconsegueixen els rendiments màxims de polímer aïllable.

7.4.2. Intents de fraccionament per HPLC

Es va intentar un fraccionament del material obtingut per HPLC. Després d'optimitzar el procediment cromatogràfic, s'observà en tots els casos un únic pic molt deformat, en el que es podria intuir la barreja de components, malgrat no aconseguir-se la seva separació. Es va procedir a realitzar un fraccionament en funció del temps d'elució (Figura 7.8). Malauradament les diferències entre les fraccions recollides en RMN i MS/MALDI-TOF no van resultar significatives.

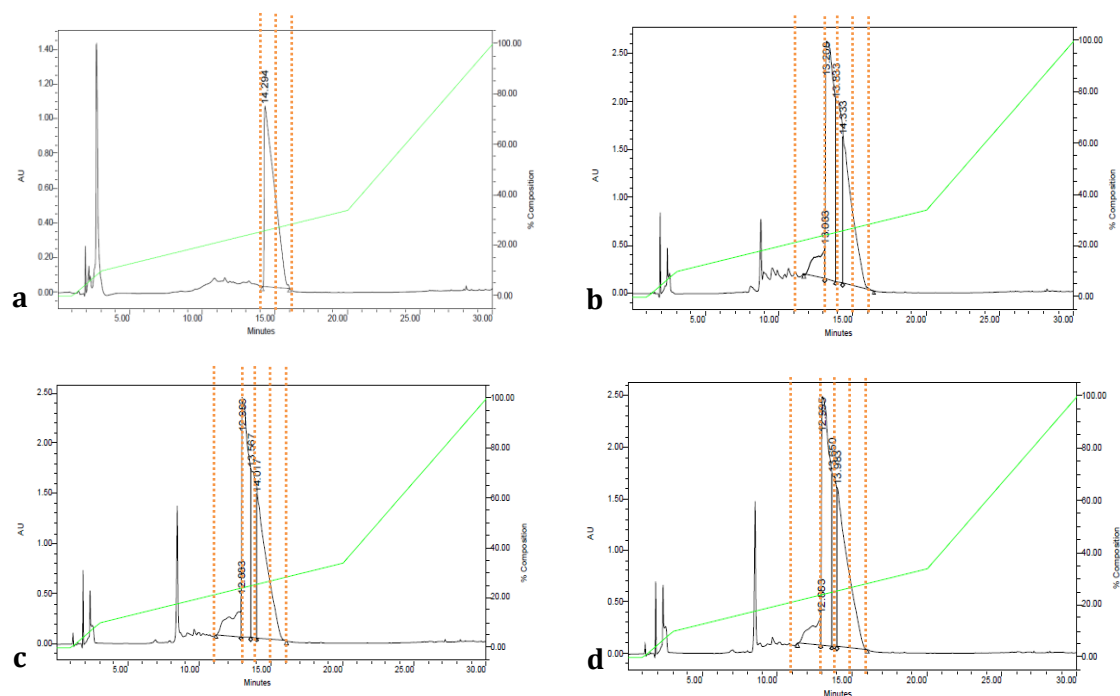


Figura 7.8. Cromatogrames corresponents als materials obtinguts en els assaigs 1 a 4 (a, b, c, i d, respectivament) de la Taula 7.1. En verd s'indica el gradient aplicat (Condicions de treball: flux de fase mòbil de 1 mL/min en gradient de polaritat decreixent d'aigua i acetonitril amb un contingut de 0,045% i 0,036% de TFA, respectivament). S'indica el fraccionament amb línies verticals.

7.4.3. Ressonància magnètica nuclear

Les fraccions eluides per HPLC es van analitzar per RMN-1H. A mode d'exemple, a la Figura 7.9 es mostren uns espectres tipus. Com es pot observar, en tots els espectres es va fer evident la presència dels protons corresponents als anells pirrolidínics de la prolina. La manca de resolució d'aquests estaria relacionada amb la naturalesa polimèrica del material.

En els espectres estan presents també els senyals característics de la piridina així com un senyal al voltant de 7,0 ppm corresponent a grups fenil. Tot i que la relació d'integració d'aquests senyals respecte als dels anells pirrolidínics no era constant, cosa que podria indicar que es tractaria de restes de la piridina utilitzada com a dissolvent o de restes del fosfat de difenil provinent de la reacció, cal recordar que es tracta de fraccions recollides de l'elució per HPLC. No obstant, tots els intents posteriors d'eliminar aquests senyals mitjançant rentats del material varen resultar infructuosos.

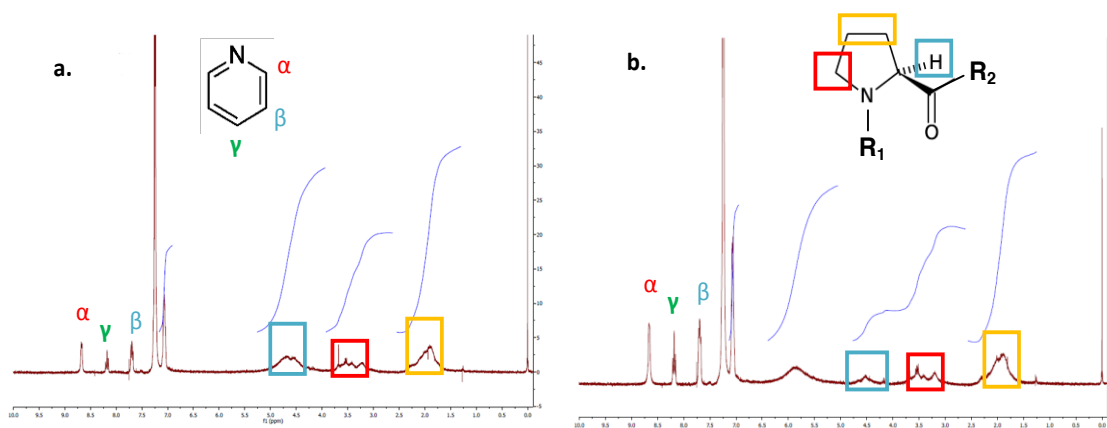


Figura 7.9. Espectres RMN-1H (300 MHz, CDCl_3) (a) de la primera fracció de l'assaig 1 (Figura 7.8.a; Taula 7.1) i (b) de la segona fracció de l'assaig 2 (Figura 7.8.b; Taula 7.1), que es corresponen en temps de retenció en l'anàlisi per HPLC.

7.4.4. Espectrometria de masses (MALDI-TOF)

Els materials polimèrics obtinguts van ser sotmesos a MS/MALDI-TOF utilitzant com a matriu àcid 2,5-dihidroxibenzoic. En les figures següents es mostren els espectres d'alguns dels materials obtinguts.

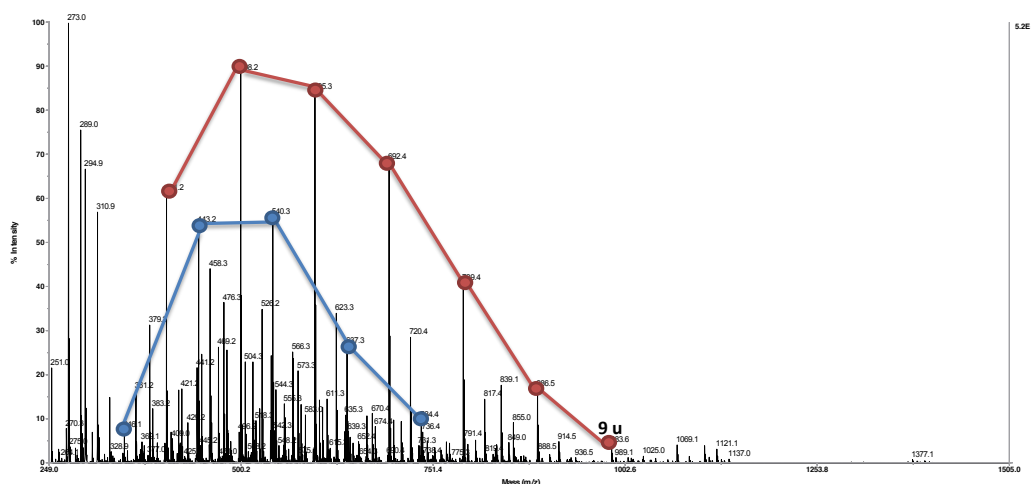


Figura 7.10. Espectre MS/MALDI-TOF corresponent al material obtingut en l'assaig 2 (Pyr, t=48 h) (Taula 7.1).

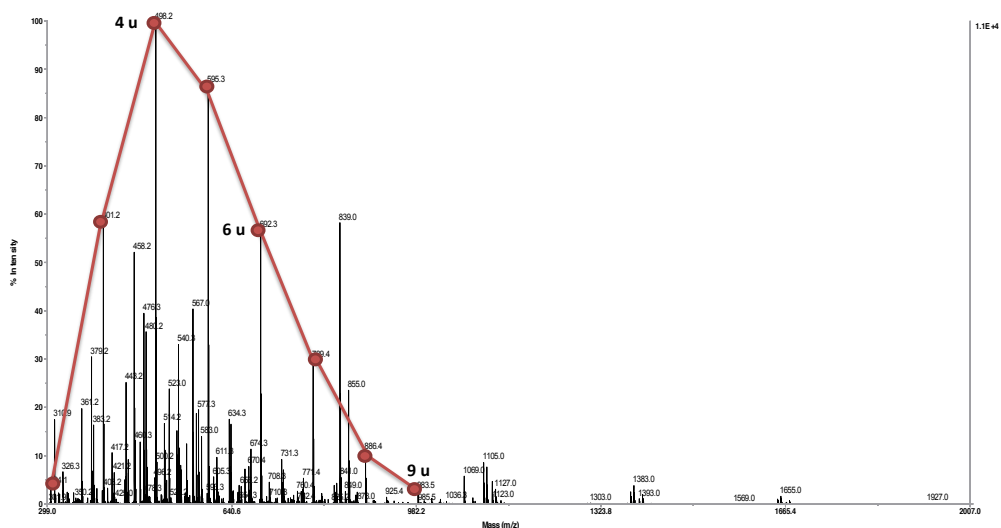


Figura 7.11. Espectre MS/MALDI-TOF corresponent al material obtingut en l'assaig 3 (Pyr, t=120 h) (Taula 7.1).

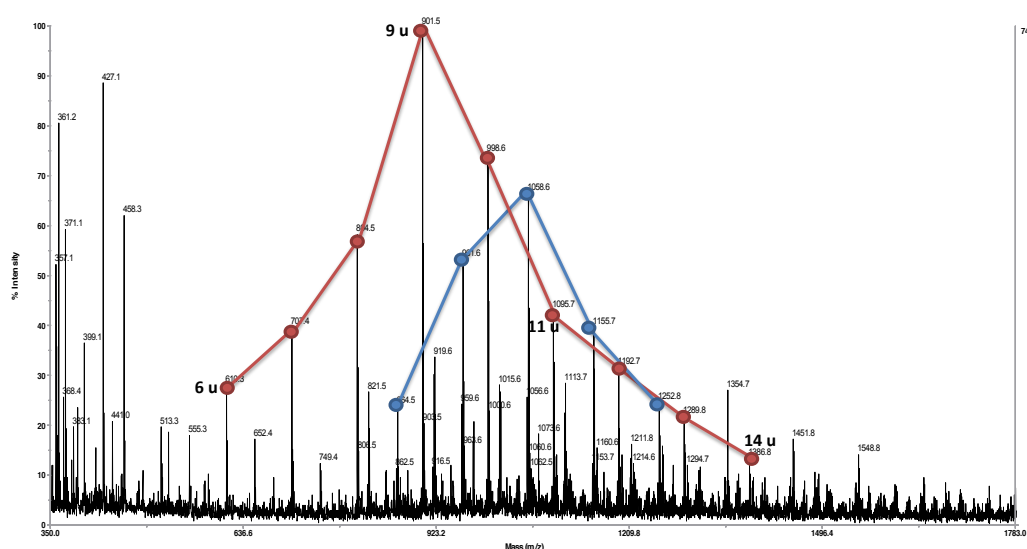


Figura 7.12. Espectre MS/MALDI-TOF corresponent al material obtingut en l'assaig 13 (DMF, TEA, 48 h) (Taula 7.1).

L'estudi dels espectres de masses revela en tots els casos sèries de senyals separades 97 unitats, la qual cosa es pot atribuir a una unitat de prolina. Aquest fet confirmaria la presència de estructures de tipus oligoprolina en la mostra. No obstant, aquestes sèries es troben desplaçades respecte als valors corresponents a un polímer constituït exclusivament per unitats de prolina. Aquest desplaçament es va atribuir a la presència de grups terminals indeterminats en la oligoprolina.

Pel que fa al grau de polimerització, es pot observar la formació d'un pèptid d'un màxim de 9 unitats de prolina en utilitzar piridina com a dissolvent en la reacció,

essent el pèptid majoritari en aquest cas al voltant de les 4 unitats de prolina (Figura 7.10 i 7.11). En canvi, quan s'usa DMF com a dissolvent el grau de polimerització arriba a 14 unitats amb un màxim a 9 unitats (Figura 7.12). Així doncs, es pot concloure que l'ús de DMF condueix a polímers de major llargada, i també amb més dispersió.

Quan es compara el resultat d'assaigs que difereixen en el temps de reacció (Figures 7.10 i 7.11) es pot comprovar que un increment d'aquest temps no sembla traduir-se en un increment significatiu ni del rendiment de la reacció, tal como ja s'ha esmentat, ni tampoc en un increment del grau de polimerització.

7.4.5. Proves de solubilitat

L'objectiu final pel que es va abordar la síntesi d'oligoprolines per polimerització de l'aminoàcid era poder disposar de manera fàcilment assequible de quantitats considerables d'oligoprolina per a ser utilitzada com a SQ en cromatografia en contracorrent (CCC). Aquest tipus de cromatografia líquid-líquid en que per dur a terme la separació d'enantiòmers cal incorporar el SQ en una de les fases líquides del sistema de dissolvents, és un sistema bifàsic de solvents. Un dels requisits per a un bon SQ en CCC hauria de ser la seva solubilitat preferent/exclusiva en una de les fases del sistema líquids. D'aquesta manera el SQ no es perd en la fase mòbil en el curs de l'elució i el sistema cromatogràfic es manté estable. L'altra qualitat requerida per un bon SQ seria que la solubilitat en el líquid que ha de constituir la fase estacionaria sigui la més elevada possible, ja que de la concentració del SQ en el sistema en depèn la capacitat de càrrega del mateix i, com és conegut, la CCC és un tipus de cromatografia d'aplicació eminentment preparativa. Per aquest motiu, i malgrat les dificultats en la caracterització del material polimèric obtingut es van realitzar una senzilles proves de solubilitat que ens haurien d'orientar en la idoneïtat del polímer obtingut per l'aplicació desitjada.

Per tal de realitzar les diferents proves qualitatives de solubilitat s'utilitzaren els polímers obtinguts en els assaigs 5 i 16 (Taula 7.1), que corresponen a 216 hores de reacció en piridina i DMF, respectivament. En cada cas es va emprar 1 mg de mostra per 1 mL de dissolvent. Les proves es van realitzar a temperatura ambient, fent ús d'un bany d'ultrasons ocasionalment. A la Taula 7.2 es representen els resultats observats.

Taula 7.2. Solubilitat de les mostres en diferents dissolvents

Mostra	Dissolvents																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	14	16	17
5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	I
16	I	I	I	I	I	LS	I	I	I	I	I	I	LS	I	I	I	I

On S és soluble, I és insoluble i LS es refereix a lleugerament soluble. Dissolvents: 1. Aigua, 2. MeOH, 3. EtOH, 4. 2-PrOH, 5. 1-BuOH, 6. ACN, 7. Acetona, 8. DMF, 9. THF, 10. MTBE, 11. DEG, 12. Formamida, 13. DCM, 14. TCM, 15. Èter dietílic, 16. Toluè, 17. Hexà.

La solubilitat qualitativament més elevada en un ampli ventall de dissolvents es va observar pel polímer obtingut utilitzant piridina com a dissolvent de la reacció. Aquest resultat estaria d'acord amb els resultats provinents dels espectres MS/MALDI-TOF. Així, els polímers de mida molecular inferior es mostrarien més solubles que els de pes molecular més gran. No obstant, la considerable insolubilitat dels polímers obtinguts en DMF, malgrat tractar-se de molècules que, com a molt tenen 14 unitats de prolina, ens va fer pensar en la gran influència que exerceix el grup indeterminat present en aquests oligòmers en la solubilitat global. Aquest fet, ens va portar a abandonar el projecte en aquest punt.

7.5. Notes concloents

D'acord amb els resultats de la part experimental es poden concloure les següents afirmacions respecte els resultats obtinguts:

1. El protocol proposat per Nishi i col·laboradors [119] sobre la síntesi de pèptids per polimerització brinda orientacions generals bàsiques vàlides com són els reactius a utilitzar i les condicions inicials de reacció. No obstant, no es descriuen les condicions de manteniment de la reacció, ni els mètodes de purificació.
2. D'acord amb els resultats obtinguts en diferents dissolvents i en diferents temps de reacció es pot concloure que l'ús de piridina com a dissolvent condueix a una major quantitat de polímer amb cadenes d'oligoprolina més curtes, però també amb menys dispersió pel que fa a la mida molecular. Tot això resulta en una major solubilitat del producte obtingut en diversos dissolvents.
3. Contràriament, l'ús de DMF amb una amina terciària en la reacció de polimerització condueix a l'obtenció d'un polímer amb cadenes de poliprolina més llargues i més dispersió de mida molecular, fet que resulta en una marcada insolubilitat del cru en els diferents dissolvents provats, tant polars com apolars.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

- [1] G. Pályi, C. Zucchi, L. Caglioti, "Dimensions of Biological Homochirality", in *Adv. Biochirality*, G. Pályi, C. Zucchi, L. Caglioti (Eds.), Elsevier, (1999) 3–12.
- [2] C.J. Welch, "Chirality in the Natural World: Life Through the Looking Glass", in *Chirality Nat. Appl. Sci.*, W.J. Lough, I.W. Wainer (Eds.), Blackwell Publishing, (2002) 285–302.
- [3] G.F. Joyce, G.M. Visser, B. Van C. A. A., B. Van J. H., L.E. Orgel, W. Van J., "Chiral selection in poly(C)-directed synthesis of oligo(G)", *Nature*. 310 (1984) 602–604.
- [4] C. Chyba, C. Sagan, "Endogenous production, exogenous delivery and impact-shock synthesis of organic molecules: an inventory for the origins of life", *Nature*. 355 (1992) 125–132.
- [5] K. Zahnle, D. Grinspoon, "Comet dust as a source of amino acids at the Cretaceous/Tertiary boundary", *Nature*. 348 (1990) 157–160.
- [6] "Comets and the Origin of Life" in *Advances in Astrobiology and Biogeophysics* P.J. Thomas, R.D. Hicks, C.F. Chyba, C.P. McKay (Eds.), Springer, New York, 1997.
- [7] J.R. Cronin, S. Pizzarello, "Enantiomeric excesses in meteoritic amino acids", *Science*. 275 (1997) 951–955.
- [8] M.H. Engel, S.A. Macko, "Isotopic evidence for extraterrestrial non-racemic amino acids in the Murchison meteorite", *Nature*. 389 (1997) 265–268.
- [9] G.M. Muñoz Caro, U.J. Meierhenrich, W. A. Schutte, B. Barbier, A. Segovia, H. Rosenbauer, et al., "Amino acids from ultraviolet irradiation of interstellar ice analogues", *Nature*. 416 (2002) 403–406.
- [10] M.P. Bernstein, J.P. Dworkin, S. a Sandford, G.W. Cooper, L.J. Allamandola, "Racemic amino acids from the ultraviolet photolysis of interstellar ice analogues", *Nature*. 416 (2002) 401–403.
- [11] T. Shibata, H. Morioka, T. Hayase, K. Choji, K. Soai, "Highly Enantioselective Catalytic Asymmetric Automultiplication of Chiral Pyrimidyl Alcohol", *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 471–472.
- [12] S.P. Mathew, H. Iwamura, D.G. Blackmond, "Amplification of enantiomeric excess in a proline-mediated reaction", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 43 (2004) 3317–3321.

- [13] K.J. Koch, F.C. Gozzo, S.C. Nanita, Z. Takats, M.N. Eberlin, R.G. Cooks, "Chiral transmission between amino acids: chirally selective amino acid substitution in the serine octamer as a possible step in homochirogenesis", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 41 (2002) 1721–1724.
- [14] C. Mannich, W. Krösche, "Ueber ein Kondensationsprodukt aus Formaldehyd, Ammoniak und Antipyrin", *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 250 (1912) 647–667.
- [15] A. Córdova, S. Watanabe, F. Tanaka, W. Notz, C.F. Barbas, "A Highly Enantioselective Route to Either Enantiomer of Both Alpha and Beta Amino Acid Derivatives", *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 1866–67.
- [16] L.A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy, "Chiral drugs: an overview", *Int. J. Biomed. Sci.* 2 (2006) 85–100.
- [17] G.T. Tucker, "New drug classes: Chiral switches", *Lancet.* 355 (2000) 1085–1087.
- [18] N. Rubio, "Enantioselectivitat en sistemes líquids bifàsics", 2010.
- [19] J. Hutt, A J; Valentová, "The chiral switch: The development of single enantiomer drugs", *ACTA Fac. Pharm. Univ. COMENIANE. Tomus L* (2003) 7–23.
- [20] E. Francotte, H. Kubinyi, G. Folkers, R. Manhold, W. Lindner, "Chirality in Drug Research", Wiley-VCH, 2006.
- [21] I.C. on Harmonization, <http://www.ich.org>
- [22] I.C. on Harmonization, Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances (Q6A)
- http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6A/Step4/Q6Astep4.pdf
- [23] "S. Branch, International regulation of chiral drugs", in *Chiral Sep. Tech. A Pract. Approach*. G. Subramanian. (Ed.) , 2nd Edition, Wiley-VCH, Weinheim, (2001) 319–342.
- [24] I. Agranat, H. Caner, J. Caldwell, "Putting chirality to work: the strategy of chiral switches", *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 753–68.
- [25] I. Agranat, S.R. Wainschein, "The strategy of enantiomer patents of drugs", *Drug Discov. Today.* 15 (2010) 163–70.
- [26] I. Agranat, S.R. Wainschein, E.Z. Zusman, "The predicated demise of racemic new molecular entities is an exaggeration", *Nat. Rev. Drug Discov.* 11 (2012) 972–3.
- [27] <http://www.drugs.com/stats/top100/2013/sales>

- [28] A. Rocco, Z. Aturki, S. Fanali, "Chiral separations in food analysis", *Trends Anal. Chem.* 52 (2013) 206–225.
- [29] H.S.M. Ali, R. Pätzold, H. Brückner, "Gas chromatographic determination of amino acid enantiomers in bottled and aged wines", *Amino Acids.* 38 (2010) 951–958.
- [30] J. Csapó, E. Varga-Visi, K. Lóki, C. Albert, S. Salamon, "The influence of extrusion on loss and racemization of amino acids", *Amino Acids.* 34 (2008) 287–292.
- [31] J. Qiu, Q. Wang, W. Zhu, G. Jia, X. Wang, Z. Zhou, "Stereoselective Determination of Benalaxyl in Plasma by Chiral High- Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector and Application to Pharmacokinetic Study in Rabbits", *Chirality.* 55 (2007) 51–55.
- [32] C. Zadra, C. Marucchini, A. Zazzerini, "Behavior of metalaxyl and its pure R-enantiomer in sunflower plants (*Helianthus annuus*)", *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5373–5377.
- [33] H. Zhang, X. Wang, L. Jin, M. Qian, X. Wang, H. Xu, et al., "Enantioselective determination of acylamino acid fungicides in vegetables and fruits by chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry", *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 1869–1876.
- [34] A. Novell, C. Minguillón, "Chiral chromatographic methods in the analysis and purification of enantiomers", in *Stereoselective Synth. Drugs Nat. Prod.*, V. Andrushko, N. Andrushko (Eds.) , 1st Edition, Wiley, (2013) 1601–1628.
- [35] G. Uray, "Determination of enantiomeric purity via formation of diastereomers. Nuclear magnetic resonance", in *Stereoselective Synth. Ser. Methods Org. Chem.*, G. Helmchen, R.W. Hoffmann, M. J, S. E (Eds.), Thieme, Stuttgart (Germany), (1995) 253–292.
- [36] M. Bertrand, A. Chabin, A. Brack, F. Westall, "Separation of amino acid enantiomers via chiral derivatization and non-chiral gas chromatography", *J. Chromatogr. A.* 1180 (2008) 131–137.
- [37] W. Lindner, "Determination of enantiomeric purity via formation of diastereomers. Chromatographic methods", in *Stereoselective Synth. Ser. Methods Org. Chem.*, G. Helmchen, R.W. Hoffmann, M. J, E. Schauman (Eds.), Thieme, Stuttgart (Germany), (1995) 225–252.
- [38] W. Lindner, "Indirect separation of enantiomers by liquid chromatography", *Chromatogr. Sci. Ser.* 40 (1988) 91–130.
- [39] D.W. Armstrong, L. He, T. Yu, J.T. Lee, Y. Liu, "Enantiomeric impurities in chiral catalysts, auxiliaries, synthons and resolving agents. Part 2", *Tetrahedron: Asymmetry.* 10 (1999) 37–60.

- [40] T.J. Wenzel, "Discrimination of chiral compounds using NMR spectroscopy", Wiley-Interscience, Hoboken (NJ), 2007.
- [41] A.M. Pérez, "Enantioselectivitat de derivats de prolina com a selectors quirals en cromatografia en contracorrent", 2012.
- [42] P. Franco, C. Minguillón, "Techniques in Preparative Chiral Separation", in *Chiral Sep. Tech. A Pract. Approach.*, G. Subramanian (Ed.), 2nd Edition, Wiley-VCH, (2001) 1–23.
- [43] N.M. Maier, P. Franco, W. Lindner, "Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives", *J. Chromatogr. A.* 906 (2001) 3–33.
- [44] S. Görög, "The changing face of pharmaceutical analysis", *TrAC Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 12–17.
- [45] T.J. Ward, B.A. Baker, "Chiral separations", *Anal. Chem.* 80 (2008) 4363–4372.
- [46] M. Lämmerhofer, W. Lindner, "Recent developments in liquid chromatographic enantioseparation", in *Sep. Methods Drug Synth. Purif.*, K. Valkó (Ed.), Elsevier, (2000) 337–438.
- [47] J. Haginaka, "Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations", *J. Chromatogr. A.* 906 (2001) 253–73.
- [48] F.A. Bettelheim, W.H. Brown, M.K. Campbell, S.O. Farrell, O.J. Torres, *Introduction to General Organic and Biochemistry*.
- [49] <https://es.wikipedia.org/wiki/Prolina>
- [50] B.K. Kay, M.P. Williamson, M. Sudol, "The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains", *FASEB J.* 14 (2000) 231–41.
- [51] B.K. Ho, R. Brasseur, "The Ramachandran plots of glycine and pre-proline", *BMC Struct. Biol.* 5 (2005) 14.
- [52] C.B. Anfinsen, M.L. Anson, J.T. Edsall, F.M. Richards, G.N. Ramachandran, V. Sasisekharan, "Conformation of Polypeptides and Proteins", *Adv. Protein Chem.* 23 (1968) 283–437.
- [53] A.H. Andreotti, "Current Topics Native State Proline Isomerization: An Intrinsic Molecular Switch", *Biochemistry.* 42 (2003) 9515–9524.
- [54] I. Hudáky, H. A. Baldoni, A. Perczel, "Peptide Models XXXVIII. Proline conformers from X-ray crystallographic database and from ab initio computations", *J. Mol. Struct.* 582 (2002) 233–249.

- [55] K. Wüthrich, M. Billeter, W. Braun, "Polypeptide secondary structure determination by nuclear magnetic resonance observation of short proton-proton distances", *J. Mol. Biol.* 180 (1984) 715–740.
- [56] W.J. Wedemeyer, E. Welker, H.A. Scheraga, "Current Topics Proline Cis - Trans Isomerization and Protein Folding", *Biochemistry.* 41 (2002) 14637–14644.
- [57] T. Drakenberg, K.-I. Dahlqvist, S. Forsén, "The Barrier to Internal Rotation in Amides. IV. N,N-Dimethylamides. Substituent and Solvent Effects", *J. Phys. Chem.* 76 (1972) 2178–2183.
- [58] S.G. Stepanian, I.D. Reva, E.D. Radchenko, L. Adamowicz, "Conformers of Nonionized Proline . Matrix-Isolation Infrared and Post-Hartree - Fock ab Initio Study", *J. Phys. Chem. A.* 105 (2001) 10664–10672.
- [59] S.X. Tian, J. Yang, "Effects of intramolecular hydrogen bonding on the ionization energies of proline", *Angew. Chemie. Int. Ed. Engl.* 45 (2006) 2069–2072.
- [60] X.G. Hu, L. Hunter, "Stereoselectively fluorinated N-heterocycles: a brief survey", *J. Org. Chem.* 9 (2013) 2696–2708.
- [61] P.M. Cowan, S. McGavin, "Structure of Poly-L-Proline", *Nature.* 176 (1955) 501–503.
- [62] W. Traub, U. Shmueli, "Structure of poly-L-proline I", *Nature.* 198 (1963) 1165–1166.
- [63] <http://gepard.bioinformatik.uni-saarland.de/research/protein-protein-interaction/poly-proline-peptides>
- [64] A. A. Adzhubei, M.J.E. Sternberg, A. A. Makarov, "Polyproline-II helix in proteins: structure and function", *J. Mol. Biol.* 425 (2013) 2100–2132.
- [65] M. Moradi, V. Babin, C. Roland, C. Sagui, "A classical molecular dynamics investigation of the free energy and structure of short polyproline conformers", *J. Chem. Phys.* 133 (2010) 125104.
- [66] V.A. Davankov, A.A. Kurganov, A.S. Bochkov, "Resolution of racemates by high-performance liquid chromatography", *Adv. Chromatogr.* 22 (1983) 71-116.
- [67] M. Ohwa, M. Akiyoshi, S. Mitamura, "Chiral stationary phase for the facile resolution of β -adrenoceptor blocking agents", *J. Chromatogr. A.* 521 (1990) 122–127.
- [68] C.D. Haurou, G. Declercq, P. Ramiandrasoa, J.L. Millet, "Enantiomeric resolution of amino acid derivatives by high-performance liquid chromatography on chiral stationary phases derived from L-proline", *J. Chromatogr. A.* 547 (1991) 31–44.

- [69] W.H. Pirkle, P.G. Murray, "An instance of temperature-dependent elution order of enantiomers from a chiral brush-type HPLC column", *J. High Resolut. Chromatogr.* 16 (1993) 285–288.
- [70] W.H. Pirkle, C.J. Welch, B. Lamm, Design, "Synthesis and evaluation of an improved enantioselective naproxen selector", *J. Org. Chem.* 57 (1992) 3854–3860.
- [71] W.H. Pirkle, W.E. Bowen, "Chiral stationary phase design: a study in optimization", *J. High Resolut. Chromatogr.* 17 (1994) 629–633.
- [72] W.H. Pirkle, P.G. Murray, "Chiral stationary phase design. Use of intercalative effects to enhance enantioselectivity", *J. Chromatogr.* 641 (1993) 11–19.
- [73] W.H. Pirkle, P.G. Murray, "Observations relevant to the differential intercalation of enantiomers between the strands of brush-type chiral stationary phases", *J. Chromatogr. A.* 719 (1996) 299–305.
- [74] P. Murer, K. Lewandowski, F. Svec, J.M.J. Fre, "On-Bead Combinatorial Approach to the Design of Chiral Stationary Phases for HPLC", *Anal. Chem.* 71 (1999) 1278–1284.
- [75] J. Huang, P. Zhang, H. Chen, T. Li, "Preparation and evaluation of proline-based chiral columns", *Anal. Chem.* 77 (2005) 3301–8.
- [76] J. Huang, H. Chen, P. Zhang, T. Li, "Improvement of proline enantioselective stationary phases by replacing the 9-fluorenylmethoxycarbonyl group", *J. Chromatogr. A.* 1109 (2006) 307–311.
- [77] J. Huang, H. Chen, T. Li, "Improvement of proline chiral stationary phases by varying peptide length and linker", *J. Chromatogr. A.* 1113 (2006) 109–115.
- [78] P. Franco, C. Minguillon, L. Oliveros, "Solvent versatility of bonded cellulose-derived chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography and its consequences in column loadability", *J. Chromatogr. A.* 793 (1998) 239–247.
- [79] P. Franco, C. Minguillon, L. Oliveros, "Bonded cellulose-derived high-performance liquid chromatography chiral stationary phases III . Effect of the reticulation of the cellulose derivative on performance", *J. Chromatogr. A.* 791 (1997) 37–44.
- [80] C. Minguillón, P. Franco, L. Oliveros, "Bonded cellulose-derived high-performance liquid chromatography chiral stationary phases II . Influence of the porosity of the silica gel matrix on performance", *J. Chromatogr. A.* 728 (1996) 415–422.

- [81] C. Minguillón, P. Franco, L. Oliveros, "Bonded cellulose-derived high-performance liquid chromatography chiral stationary phases I. Influence of the degree of fixation on selectivity", *J. Chromatogr. A.* 728 (1996) 407–414.
- [82] P. Franco, A. Senso, L. Oliveros, C. Minguillon, "Covalently bonded polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A.* 906 (2001) 155–170.
- [83] P. Franco, A. Senso, C. Minguillon, "3,5-Dimethylphenylcarbamates of amylose, chitosan and cellulose bonded on silica gel: Comparison of their chiral recognition abilities as high-performance liquid chromatography chiral stationary phases", *J. Chromatogr. A.* 796 (1998) 265–272.
- [84] T. Ikai, Y. Okamoto, "Structure Control of Polysaccharide Derivatives for Efficient Separation of Enantiomers by Chromatography", *Chem. Rev.* 109 (2009) 6077–6101.
- [85] G.K.E. Scriba, "Chiral Recognition Mechanisms in Analytical Separation Sciences", *Chromatographia.* 75 (2012) 815–838.
- [86] C.M. Deber, F.A. Bovey, J.P. Carver, E.R. Blout, "Nuclear Magnetic Resonance Evidence for cis-Peptide Bonds in Proline Oligomers", *Org. Biol. Chem.* 235 (1970) 6191–6198.
- [87] R. Sancho, A.M. Pérez, C. Minguillón, "A (4R)-Hydroxy-L-proline-derived chiral scaffold and its oligomers as chiral selectors in liquid chromatography chiral stationary phases for enantioseparation", *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 905–914.
- [88] F. Albericio, M. Cruz, L. Debéthune, R. Eritja, E. Giralt, A. Grandas, et al., "An improved synthesis of N-[(9-Hydroxymethyl)-2-Fluorenyl]Succinamic Acid (HMFS), a versatile handle for the Solid-Phase Synthesis of biomolecules", *Synth. Commun.* 31 (2001) 225–232.
- [89] L. Oliveros, C. Minguillón, B. Desmazières, P.-L. Desbène, "Silica-bonded chiral stationary phases with structurally simple π -donor chiral selectors for high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A.* 589 (1992) 53–59.
- [90] L. Oliveros, C. Minguillón, T. González, "Comparison between silica-bonded chiral stationary phases derived from 3,5-disubstituted N-benzoyl-(S)-phenylalanine and (S)-cyclohexylalanine in the resolution of racemic compounds by liquid chromatography", *J. Chromatogr. A.* 672 (1994) 59–65.
- [91] R. Sancho, C. Minguillón, "Polyproline derivatives as chiral selectors in high performance liquid chromatography: chromatographic and conformational studies", *J. Chromatogr. B.* 875 (2008) 93–101.
- [92] R. Zhang, J.S. Madalengoitia, "Conformational stability of proline oligomers", *Tetrahedron Lett.* 37 (1996) 6235–6238.

- [93] P. Zhang, P.L. Polavarapu, J. Huang, T. Li, "Spectroscopic Rationalization of the Separation Abilities of Decaproline Chiral Selector in Dichloromethane – Isopropanol Solvent Mixture", *Chirality*. 105 (2007) 99–105.
- [94] A. Cavazzini, L. Pasti, A. Massi, N. Marchetti, F. Dondi, "Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: a review", *Anal. Chim. Acta*. 706 (2011) 205–222.
- [95] W. Lao, J. Gan, "Doubly tethered tertiary amide linked and ionically bonded diproline chiral stationary phases", *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2359–2368.
- [96] W. Lao, J. Gan, "Temperature effects on a doubly tethered diproline chiral stationary phase: Hold-up volume, enantioselectivity and robustness", *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3052–3059.
- [97] W. Lao, J. Gan, "Evaluation of triproline and tri- α -methylproline chiral stationary phases: retention and enantioseparation associated with hydrogen bonding", *J. Chromatogr. A*. 1216 (2009) 5020–5029.
- [98] M. Ashtari, N.M. Cann, "Proline-based chiral stationary phases: a molecular dynamics study of the interfacial structure", *J. Chromatogr. A*. 1218 (2011) 6331–6347.
- [99] M. Ashtari, N.M. Cann, "Poly-proline-based chiral stationary phases: a molecular dynamics study of triproline, tetraproline, pentaproline and hexaproline interfaces", *J. Chromatogr. A*. 1265 (2012) 70–87.
- [100] "Z. Dai, G. Ye, C.U. Pittman, T. Li, Steric effects on the enantiodiscrimination of diproline chiral stationary phases in the resolution of racemic compounds", *J. Chromatogr. A*. 1218 (2011) 5498–503.
- [101] A.M. Stalcup, "Chiral separations", *Annu. Rev. Anal. Chem.* 3 (2010) 341–63.
- [102] M. Lämmerhofer, "Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: mechanisms and modern chiral stationary phases", *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 814–56.
- [103] W.H. Pirkle, T.C. Pochapsky, "Intermolecular ^1H nuclear Overhauser effects in diastereomeric complexes: Support for a chromatographically derived chiral recognition model", *J. Am. Chem. Soc.* 2 (1986) 5627–5628.
- [104] W.H. Pirkle, T.C. Pochapsky, G.S. Mahler, D.E. Corey, D.S. Reno, D.M. Alessi, "Useful and easily prepared chiral stationary phases for the direct chromatographic separation of the enantiomers of a variety of derivatized amines, amino acids, alcohols, and related compounds", *J. Org. Chem.* 51 (1986) 4991–5000.

- [105] Y. Wu, Y. Wang, A. Yang, T. Li, "Screening of mixture combinatorial libraries for chiral selectors: a reciprocal chromatographic approach using enantiomeric libraries", *Anal. Chem.* 71 (1999) 1688–1691.
- [106] Y. Wang, T. Li, "Screening of a parallel combinatorial library for selectors for chiral chromatography", *Anal. Chem.* 71 (1999) 4178–4182.
- [107] E. Brahmachary, F.H. Ling, F. Svec, J.M.J. Fréchet, "Chiral recognition: Design and preparation of chiral stationary phases using selectors derived from Ugi multicomponent condensation reactions and a combinatorial approach", *J. Comb. Chem.* 5 (2003) 441–450.
- [108] C. Ravelet, E. Peyrin, "Recent developments in the HPLC enantiomeric separation using chiral selectors identified by a combinatorial strategy", *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1322–1331.
- [109] C. Minguillón, "Countercurrent Chromatography, Scope and Perspectives: Application to Chirotechnology", *Chem. Eng. Technol.* 35 (2012) 35–45.
- [110] B. Delgado, E. Pérez, M.C. Santano, C. Minguillón, "Enantiomer separation by counter-current chromatography. Optimisation and drawbacks in the use of L-proline derivatives as chiral selectors", *J. Chromatogr. A.* 1092 (2005) 36–42.
- [111] B. Gutiérrez, N. Rubio, C. Minguillón, Evaluation of L-proline derivatives as chiral carriers in the separation of enantiomers by membrane techniques, *Desalination*. 200 (2006) 117–119.
- [112] O. Lecník, M.G. Schmid, A. Presser, G. Gübitz, Influence of structure and chirality of the selector on the chiral recognition of amino acids using ligand-exchange capillary electrophoresis., *Electrophoresis*. 23 (2002) 3006–3012.
- [113] A. Novell, C. Minguillón, "Octaproline, a conformationally flexible chiral selector in liquid chromatographic enantioseparation", *J. Chromatogr. A.* 1363 (2014) 109–118.
- [114] R. Sancho, A. Novell, F. Svec, C. Minguillón, "Monolithic silica columns functionalized with substituted polyproline-derived chiral selectors as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography", *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 2805–2813.
- [115] A. Novell, C. Minguillón, "Monolithic silica columns with covalently attached octaproline chiral selector. Dependence of performance on derivatization degree and comparison with a bead-based analogue", *J. Chromatogr. A.* 1384 (2015) 124–132.
- [116] A. Novell, A. Méndez, C. Minguillón, "Effects of supercritical fluid chromatography conditions on enantioselectivity and performance of

- polyproline-derived chiral stationary phases", *J. Chromatogr. A.* 1403 (2015) 138–143.
- [117] Z.H.I. Dai, G. Ye, C.U.P. Jr, T. Li, "Solution-Phase Synthesis and Evaluation of Tetraproline Chiral Stationary Phases", *Chirality*. 338 (2012) 329–338.
- [118] Y. Iizuka, C. Uchida, K. Wakamatsu, M. Oya, "Synthesis and Properties of High Molecular Weight Polypeptides Containing Proline", *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 66 (1993) 1269–1272.
- [119] N. Nishi, M. Tsunemi, H. Hayasaka, B. Nakajima, S. Tokura, "Polymerization reaction with diphenylphosphoryl azide. Preparation of poly(α -amino acid)s by direct polycondensation of α -amino acids", *Makromol. Chem.* 192 (1991) 1789–1798.
- [120] O.P. Gulín, F. Rabanal, E. Giralt, "Efficient preparation of proline N-carboxyanhydride using polymer-supported bases", *Org. Lett.* 8 (2006) 5385–5388.